

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Amanda Barbosa Lima

**DETERMINAÇÃO SIMPLES E SENSÍVEL DE SIBUTRAMINA E EFEDRINA EM
CHÁS DIETÉTICOS USANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO COM
VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ADSORTIVA**

Diamantina

2022

Amanda Barbosa Lima

**DETERMINAÇÃO SIMPLES E SENSÍVEL DE SIBUTRAMINA E EFEDRINA EM
CHÁS DIETÉTICOS USANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO COM
VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ADSORTIVA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Diamantina

2022

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

L732d Lima, Amanda Barbosa
2022 DETERMINAÇÃO SIMPLES E SENSÍVEL DE
SIBUTRAMINA E EFEDRINA EM CHÁS DIETÉTICOS
USANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO COM
VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO
ADSORTIVA [manuscrito] / Amanda Barbosa
Lima. -- Diamantina, 2022.
98 p. : il.

Orientador: Prof. Wallans Torres Pio dos
Santos.

Tese (Doutorado Multicêntrico em Química)
-- Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-
Graduação em Multicêntrico em Química de
Minas Gerais, Diamantina, 2022.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-2886 e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

AMANDA BARBOSA LIMA

DETERMINAÇÃO SIMPLES E SENSÍVEL DE SIBUTRAMINA E EFEDRINA EM CHÁS DIETÉTICOS USANDO UM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO COM VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ADSORTIVA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Multicêntrico em química, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nível de Doutorado, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

Data de aprovação 10/03/2022.

Dr. WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS (UFVJM)

Presidente da Banca

Dr. LUCAS FRANCO FERREIRA(UFVJM)

Membro Interno

Dr. SANDRO LUIZ BARBOSA DOS SANTOS (UFVJM)

Membro Interno

Dr. RODRIGO ALEJANDRO ABARZA MUNOZ (UFU)

Membro Externo

Dr. ERIC DE SOUZA GIL (UFG)

Membro Externo



Documento assinado eletronicamente por Wallans Torres Pio dos Santos, Coordenador(a), em 10/03/2022, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por Lucas Franco Ferreira, Docente, em 10/03/2022, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de](#)



[outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por Sandro Luiz Barbosa dos Santos, servidor (a), em 10/03/2022, às 20:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por Eric de Souza Gil, Usuário Externo, em 11/03/2022, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, Usuário Externo, em 11/03/2022, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 0632661 e o código CRC 89B0E54E.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos a todos que me apoiaram durante esse percurso, e tornaram possível a concretização deste trabalho. Em particular, gostaria de agradecer:

- ✓ A Deus pela vida e por me manter firme nessa caminhada em busca dos meus sonhos.
- ✓ Aos meus pais, Clemência e Hélio, pelo amor, dedicação, confiança, ensinamentos, e por não medirem esforços para que eu alcance meus objetivos.
- ✓ Aos meus irmãos, Aline, Amélia e Alan, pela amizade e por sempre me ajudarem nessa etapa, cada um da sua forma.
- ✓ Ao Rubens, por todo o carinho, dedicação e por deixar meus dias mais leves. Agradeço também a sua família.
- ✓ Ao Téo, pela companhia e carinho.
- ✓ Ao meu orientador, Wallans, pela orientação durante todo esse tempo.
- ✓ A todos os colegas e amigos de laboratório que ajudaram durante este percurso.
- ✓ Ao Instituto de Ciência e Tecnologia e todos os colegas que estiveram juntos nesse período de conciliação entre trabalho e estudo.
- ✓ À banca examinadora composta pelos professores Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Dr. Eric de Souza Gil, Dr. Lucas Franco Ferreira e Dr. Sandro Luiz Barbosa dos Santos por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.
- ✓ À Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri, em especial ao departamento de Química, pela estrutura e oportunidade de realização deste trabalho.
- ✓ Aos órgãos de fomento: CAPES, Fapemig e CNPq.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. Marthin Luther King

RESUMO

Sibutramina (SB) e Efedrina (EF) são fármacos estimulantes de uso controlado que apresentam diversos efeitos colaterais. Esses estimulantes vem sendo adicionados de forma ilegal em suplementos alimentares para fins de emagrecimento. Além disso, como essas drogas são banidas pela agência mundial antidoping (WADA,) o uso de SB e EF também vem sendo reportado em casos positivos de doping de atletas antes e durante competições esportivas. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de metodologias simples, rápidas e de baixo custo para determinação de SB e EF em amostras de produtos alimentares e fluidos biológicos. Deste modo, o presente trabalho apresenta duas novas metodologias eletroquímicas para análises desses estimulantes em amostras de chás por meio da técnica de voltametria de redissolução adsorptiva (AdSV) usando um eletrodo impresso de carbono-grafite (SPE-Gr). A SB apresentou dois processos de oxidação irreversíveis no SPE-Gr em torno de +0,5 V e +0,8V (vs Ag), sendo o primeiro processo mais nítido e usado para sua detecção pela AdSV em meio de tampão Britton-Robinson (TBR) 0,1 molL⁻¹ pH 7,0 com um tempo de acumulação de 15 minutos. Nessas condições foi obtido uma faixa linear de trabalho para determinação de SB de 2,0 a 120 µmolL⁻¹ (r² =0,999) com limite de detecção de 0,3 µmolL⁻¹. Além disso, a estabilidade da resposta do SPE-Gr foi obtida para análises sucessivas de SB com um desvio padrão relativo (DPR) de 3,7% e 6,0 %, usando o mesmo (N=8) e diferentes (N=3) SPE-Gr, respectivamente. A determinação da EF foi otimizada em tampão borato 0,1 molL⁻¹ pH 10,0, onde foi observado apenas um processo de oxidação irreversível bem definido em +0,8 V no SPE-Gr. A técnica de AdSV também foi utilizada para detecção de EF com um tempo de acumulação otimizado em 4 minutos. Nessas condições, uma faixa linear foi obtida para determinação de EF entre 1,0 a 1000 µmolL⁻¹ (r² = 0,994) com LOQ de 0,165 µmolL⁻¹. A estabilidade do SPE-Gr mostrou também resultados adequados para detecção da EF com DPR de 1,3 % e 2,8%, usando o mesmo (N=3) e diferentes (N=3) SPE-Gr, respectivamente. Os estudos de adição e recuperação de EF e SB em amostras de chá dietéticos mostraram resultados próximos a 100%. Os estudos da determinação de EF em amostras biológicas apresentaram uma perspectiva de aplicação no controle doping. Portanto, os métodos propostos para a determinação de SB e EF demonstram ser uma alternativa simples e de baixo custo para análises desses estimulantes em amostras de chás dietéticos, proporcionando uma triagem eletroquímica rápida para avaliação da contaminação desses suplementos alimentares.

Palavras chave: Alimentos adulterados, Controle de Doping, Eletrodos impressos, Estimulantes, triagem eletroquímica.

ABSTRACT

Sibutramine (SB) and Ephedrine (EF) are stimulant drugs of controlled use, which presents many side effects. These stimulants have been illegally added in food supplements in order to achieve the weight loss. Furthermore, as these drugs are banned by World Anti-doping Agency (WADA), the use of SB and EF has also been reported in positive cases in doping control of athletes before and during sports competitions. In this context, it is very important the development of simple, fast and low-cost methods for SB and EF determination in food supplements and biological samples. Thereby, this work presents two new electrochemical methodologies to detect these stimulants in tea samples using the adsorptive stripping voltammetry (AdSV) technique with carbon-graphite screen-printed electrode (SPE-Gr). The SB exhibited two irreversible oxidation processes at SPE-Gr around +0.5 V and 0.8 V (vs AG), which the first process was used for its detection by AdSV in Britton-Robinson buffer 0.1 molL⁻¹ pH 7.0, with an accumulation time of 15 min. Under these conditions, a linear range was obtained ($r^2 = 0.999$) for SB determination between 2.0 and 120 μmolL^{-1} , with limit of detection (LOD) of 0.3 μmolL^{-1} . Moreover, a stability of the electrochemical response was achieved using the same (N=8) or different (N=3) SPE-Gr with relative standard deviations (RSD) of 3.7% and 6.0 %, respectively. The determination of EF was optimized in borate buffer 0.1 molL⁻¹ pH 10.0, where only one well-defined irreversible oxidation process was observed at +0.8V at the SPE-Gr. AdSV technique was also used for EF detection with an accumulation time of 4 min. In these conditions, a linear range was obtained for EF determination between 1.0 and 1000 μmolL^{-1} with a low LOD of 0.165 μmolL^{-1} . The stability of SPE-Gr showed to be adequate for EF detection with RSD of 1.3 % e 2.8% using the same (N=3) or different (N=3) SPE-Gr, respectively. The addition-recovery studies of SB and EF in diet teas showed recoveries close to 100%. The obtained results for EF determination in biological samples show a perspective for application in doping control. Therefore, the proposed methods for SB and EF determination demonstrate to be a simple and low-cost alternative to detect these stimulants in diet tea samples, providing a fast electrochemical screening to evaluate the contamination of these food supplements.

Keywords: Doping control, Electrochemical screening, Food contamination, Screen-printed electrodes, Stimulants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos Eletrodo de trabalho (ET) Eletrodo de referência(ER) e Contra eletrodo(CE).Estrutura do trabalho	20
Figura 2 - (A) Esquema do sinal de excitação na VC. (B) Voltamograma cíclico obtido pela VC para um composto eletroativo com processo eletroquímico reversível.	28
Figura 3 – VC obtido em um BDDE em solução de tampão acetato 0,1 molL ⁻¹ pH 4,7 com adição de 7,5 mgL ⁻¹ de paracetamol (linha contínua) e 9,6 mgL ⁻¹ cafeína (linha pontilhada).	30
Figura 4 - Esquema de excitação do sinal na DPV (A). Voltamograma resultante da excitação (B)	32
Figura 5 - Esquema da configuração do SPE.	35
Figura 6 - Estrutura molecular do Cloridrato de Sibutramina monohidratado.	39
Figura 7 - Estrutura molecular do Cdrato de Efedrina.	41
Figura 8 – Embalagens dos chás dietéticos utilizados	46
Figura 9 - Salivette com rolo de algodão de tampa azul de pressão, com etiqueta de papel.	47
Figura 10 - Imagem do sistema de detecção no SPE por adição drop-casting para eletroanálise.	48
Figura 11 - VCs em TBR 0,1 molL ⁻¹ pH 7,0 em SPE-Gr (linha preta) com adição de 0,5 mM de SB (linha vermelha). Na inserção a estrutura da molécula de SB é apresentada. Todas as varreduras de potenciais foram iniciadas em -1,0 V na direção positiva, com uma taxa de varredura de 50 mV s ⁻¹	51
Figura 12 - VCs em diferentes pHs (2,0 a 10,0) em tampão BR 0,1 M com adição de 0,5 mM de SB. Todas as varreduras potenciais foram iniciadas em 1,0 V na direção positiva, com uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . Na inserção e apresentada a relação e regressão linear obtida entre Epa vs pH do primeiro processo de oxidação da SB no SPE-Gr.....	53
Figura 13 - Distribuição da molécula de Sb em diferentes pHs.	54
Figura 14 - Relação entre Ipa obtidas na Figura 12 em função do pH para o primeiro processo de oxidação da SB no SPE-Gr.....	54
Figura 15 - VCs registrados no SPE-Gr para soluções de TBR (linhas vermelhas) e tampão fosfato (linhas pretas), ambos a 0,1 M pH 7,0, antes (linhas tracejadas) e depois (linhas sólidas) da adição de SB a 0.2 mM. Todas varreduras de potencial iniciaram a 0,0 V no sentido anódico com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	56

Figura 16 - VCs em TBR 0,1 molL ⁻¹ pH 7,0 com adição de SB 0,5 m molL ⁻¹ em diferentes velocidades (10 a 150 mV s ⁻¹) usando SPE-Gr.....	57
Figura 17 - Gráficos plotados dos dados obtidos da Figura 16 para relações de (A) I _{pa} vs v _{1/2} , (B) I _{pa} vs v, e (C) log I _{pa} vs log v.	57
Figura 18 – DPV da SB mol ⁻¹ em meio à TBR pH 7,0 0,1 molL ⁻¹ . A linha tracejada indica a W _{1/2} da I _p	59
Figura 19 - Mecanismo proposto para eletrooxidação da SB proposto por Freitas e colaboradores (FREITAS et al., 2019).....	60
Figura 20 - DPVs em TBR 0,1 molL ⁻¹ pH 7,0 com adição de SB 0,5 mmolL ⁻¹ em diferentes eletrodos impressos de carbono. Amplitude de 80 mV e velocidade de varredura de 30 mV s ⁻¹	60
Figura 21 - Respostas de correntes dos picos de oxidação divididos pela largura de meia altura em função do Step (A) com amplitude constante de 50 mV e da Amplitude (B) com step constante de 5mV. Ambas as medidas foram obtidas a partir de DPVs de 100 μmolL ⁻¹ de SB no SPE-Gr em de TBR 0.1 M (pH 7.0).....	62
Figura 22 - Respostas da carga do pico de oxidação em função do tempo de acumulação em 100 mmolL ⁻¹ de SB no SPE-Gr em 0,1 M TBR (pH 7,0). Na inserção estão os AdSDPVs registrados em cada tempo no SPE-Gr a 80 mV s ⁻¹ e amplitude de 100 mV.	63
Figura 23 - I _{pa} obtidas em função do número de medidas para oito análises consecutivas de uma solução de SB 100 μmol L ⁻¹ usando um mesmo SPE-Gr (A) e três análises em diferentes SPEs-Gr em uma solução de SB 50 μmolL ⁻¹ (B). Nas inserções são mostrados os AdSDPVs das respectivas análises realizados em TBR 0.1 molL ⁻¹ (pH 7.0) com velocidade de varredura a 80 mV s ⁻¹ , amplitude 100 mV e tempo de acumulação de 15 minutos. .	65
Figura 24 - AdDPVs da SB em concentrações de 2,0 a 120 μmolL ⁻¹ em TBR 0.1 molL ⁻¹ (pH 7.0) no SPE-Gr. Na inserção é mostrada a regressão linear e uma ampliação dos menores sinais, correspondentes às concentrações de 2,0 a 10 μM. Tempo de acumulação de 15 min. Amplitudes de 100 mV e velocidade de varredura de 80 mV s ⁻¹	66
Figura 25 - AdSDPVs no SPE-Gr de uma amostra de chá diluído (10 vezes) em TBR 0,1molL ⁻¹ (pH 7,0) (linha preta) em (A) sem e com adição de 50,0 μmolL ⁻¹ de SB (linha vermelha) e em (B) sem e com adição de 2,5 μM de SB (linha azul), bem como somente da solução padrão de SB a 2,5 μM em TBR (linha vermelha). Na inserção estão os voltamogramas com correção de linha de base. As condições de ambos os estudos: Amplitude de 100 mV e velocidade de varredura 80 mV s ⁻¹ , tempo de acumulação de 15 min.....	68
Figura 26 - VCs em diferentes pHs (7,0 a 12,0) em tampão B-R 0,1 M com adição de 1,0 mmolL ⁻¹ de EF. As varreduras potenciais foram iniciadas em 1,0 V na direção positiva, com uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	70
Figura 27 - Distribuição da molécula de EF em diferentes pHs.	71

Figura 28 - Relação entre Ipa obtidas na Figura 26 em função do pH para processo de oxidação da EF no SPE-Gr.....	71
Figura 29 - VCs em tampão Borato 0,1 molL ⁻¹ pH 10,0 com adição de EF 1,0 mmolL ⁻¹ em diferentes velocidades (20 a 90 mV s ⁻¹) usando SPE-Gr.....	74
Figura 30 - Gráficos plotados dos dados obtidos da Figura 29 para relações de (A) Ipa vs v _{1/2} , (B) Ipa vs v, e (C) log Ipa vs log v.....	74
Figura 31 - VCs em TBR 0,1 molL ⁻¹ , tampão de borato 0,1 molL ⁻¹ e tampão Tris, todos em pH 10,0, com adição de 1 mmolL ⁻¹ de EF usando SPE-Gr. Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	75
Figura 32 - VCs em tampão borato 0,1 molL ⁻¹ pH 10,0 com adição de EF 1,0 mmolL ⁻¹ em diferentes eletrodos impressos de carbono. Todas as varreduras potenciais foram iniciadas em 1,0 V na direção positiva, com uma taxa de varredura de 50 mV s ⁻¹	76
Figura 33 - (A) Correntes do pico de oxidação divididas pela largura de meia altura em função do step, (B) correntes do pico de oxidação divididas pela largura de meia altura em função da amplitude, ambos com 100 μmolL ⁻¹ de EF no SPE-Gr em de tampão borato 0,1 molL ⁻¹ (pH 10,0).....	78
Figura 34 - Respostas da carga do pico de oxidação em função do tempo de acumulação em 100 mmolL ⁻¹ de SB no SPE-Gr em 0,1 M TBR (pH 7,0).....	78
Figura 35 - (A) Correntes do pico de oxidação da EF 100 μmolL ⁻¹ em função do número de medidas com o mesmo eletrodo. Na inserção são mostrados os VPDs dessas medidas. (B) Correntes do pico de oxidação da EF 100 μmolL ⁻¹ em função do número de medidas com diferentes eletrodos. Na inserção são mostrados os VPDs dessas medidas.	80
Figura 36 - AdSDPVs da EF em concentrações de 1,0 a 1000 μmolL ⁻¹ em tampão Borato 0,1 molL ⁻¹ (pH 10,0) no SPE-Gr. Inserções da regressão linear e do zoom dos menores sinais, correspondantes às concentrações de 1,0 a 50 μM. Tempo de acumulação de 4 min. Amplitude de 70 mV e velocidade de 40 mV s ⁻¹	81
Figura 37 - AdSDPVs registrados em amostra de chá diluída dez vezes (linha azul) em tampão borato 0,1 molL ⁻¹ . Efedrina 50 μmolL ⁻¹ em tampão borato 0,1 molL ⁻¹ e mistura de EF e chá.	82
Figura 38 - (A) VCs registrados no SPE-Gr de tampão borato 0,1 molL ⁻¹ (pH 10) (linha vermelha) e saliva diluída dez vezes no tampão borato (linha preta). Velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ . AdSDPV de tampão borato 0,1 molL ⁻¹ (pH 10) (linha preta); saliva diluída dez vezes no tampão borato (linha azul); EF 50 μmolL ⁻¹ (linha vermelha) e EF 50 μmolL ⁻¹ + saliva diluída dez vezes (linha verde)	83
Figura 39 - AdSDPV de ácido úrico 50 μmolL ⁻¹ (linha azul); ácido ascórbico 50 μmolL ⁻¹ (linha vermelha) e EF 50 μmolL ⁻¹ (linha preta), todos em tampão borato 0,1 molL ⁻¹ (pH 10) nas condições otimizadas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades Físico-Químicas da SB	40
Tabela 2 - Propriedades Físico-Químicas da EF.....	42
Tabela 3- Parâmetros eletroquímicos otimizados para a determinação de SB.....	64
Tabela 4- Comparação de alguns métodos para determinação eletroanalítica de SB.....	69
Tabela 5- Parâmetros analíticos otimizados para a determinação de Efedrina.....	79
Tabela 6 - Comparação de alguns métodos para determinação eletroanalítica de EF.....	85

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1) -.....	30
Equação (2) -.....	30
Equação (3) -.....	32
Equação (4) -	32
Equação (5) -.....	55
Equação (6) -.....	58
Equação (7) -.....	66
Equação (8) -.....	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Considerações gerais	23
1.2 Técnicas eletroquímicas	27
<i>1.2.1 Voltametria cíclica (VC)</i>	28
<i>1.2.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV)</i>	31
<i>1.2.3 Voltametria de redissolução adsortiva (AdSV)</i>	33
1.3 Eletrodos impressos (SPE)	34
<i>1.3.1 Eletrodos impressos de carbono</i>	36
1.4 Contaminação e adulteração de suplementos alimentares	37
1.5 Controle de doping em saliva e urina humana	38
1.6 Características dos analitos investigados e seus métodos de determinação	39
<i>1.6.1 Sibutramina (SB)</i>	39
<i>1.6.2 Efedrina (EF)</i>	41
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivos específicos	44
3 PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1 Reagentes, soluções e amostras	45
3.2 Preparo das amostras de chá dietético	45
3.3 Preparo da amostra urina	47
3.4 Preparo da amostra de saliva	47
3.5 Instrumentação	48
3.6 Comportamento eletroquímico dos fármacos	49
3.7 Parâmetros de otimização da DPV	49
3.8 Otimização dos parâmetros analíticos	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Determinação da SB em amostras de chás dietéticos	51
<i>4.1.1 Comportamento eletroquímico da SB</i>	51
<i>4.1.2 Otimização dos parâmetros AdSDPV</i>	61
<i>4.1.3 Estudos dos parâmetros analíticos para determinação da SB pelo método proposto</i> ..	64
<i>4.1.4 Validação e aplicação do método proposto em amostras de chá</i>	67

<i>4.1.5 Comparação do método proposto com outros métodos eletroanalíticos reportados para determinação da SB</i>	69
4.2 Determinação da EF em amostras de chás dietéticos	70
<i>4.2.1 Comportamento eletroquímico da EF</i>	70
<i>4.2.2 Otimização dos parâmetros AdSDPV</i>	77
<i>4.2.3 Estudos dos parâmetros analíticos para determinação da EF pelo método proposto</i> ..	79
<i>4.2.4 Validação e aplicação do método proposto em amostras de chá</i>	82
<i>4.2.5 Comparação do método proposto com outros métodos eletroanalíticos reportados para determinação da EF</i>	83
<i>4.2.6 Determinação da EF em Urina e Saliva</i>	85
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	87
6 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO DO DOUTORADO	89
7 REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Fármacos são compostos utilizados como princípio ativo dos medicamentos, sendo responsáveis pela ação farmacológica dos mesmos. São os fármacos que são responsáveis pelas ações de cura ou atenuação de sintomas de enfermidades e até mesmo a erradicação de determinada doença, se seu uso for feito de forma adequada (ANVISA). A prescrição de uma medicação para um determinado paciente que sofre de uma enfermidade específica deve ser feita de maneira adequada e com dosagem equivalente, de modo que a finalidade de cura ou de diminuição de sintomas seja satisfeita. O uso não controlado dessas substâncias pode vir a gerar possíveis intoxicações, interações com outros medicamentos e alimentos, além de outros efeitos nocivos à saúde do paciente, podendo levar até ao óbito.

A contaminação ou adulteração de alimentos com diversos fármacos é um grave problema que vem sendo reportados em vários tipos de produtos, cápsulas vitamínicas, *shakes* formulações fitoterápicas, chás, etc (FRASER et al., 1997, JUNG; CLAUSEN; WEINMANN, 2006, CARVALHO et al., 2011, POMERANZ et al., 2015). Entre esses produtos alimentícios, a contaminação de fármacos em bebidas de chá vem sendo destacada, principalmente, para os vendidos como produtos naturais com intuito de emagrecimento, como por exemplo, no caso da adição indevida de sibutramina (SB) ou efedrina (EF) (THUYNE; EENOO; DELBEKE, 2006, WONG et al., 2021), que são objetos de estudo neste trabalho. Sendo assim, é de extrema importância o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para investigar a contaminação e/ou adulteração desses alimentos.

Vale ainda destacar que, o controle dos medicamentos deve ser feito por instituições competentes, para que sejam usados de maneira adequada, realizando a ação farmacológica desejada e impedindo seu uso para fins indevidos (OLIVEIRA et al., 2017). Dentre esses usos indevidos pode-se destacar a auto medicação, abuso de dosagens e o uso para melhorar o desempenho de atletas, sendo esse último caracterizado como doping Agência Mundial Antidoping, do inglês *World Anti-doping Agency* (WADA).

O conceito de doping advém da administração ou uso de medicações exógenas que tem como objetivo influenciar no desempenho de atletas durante competições esportivas (AQUINO-NETO et al., 2002). A WADA dispõe de uma listagem de medicamentos/substâncias proibidas ou restritas, e a dopagem é caracterizada pela presença de tais substâncias no organismo do atleta. Essas substâncias proibidas incluem cinco classes

farmacológicas, sendo elas anabolizantes, analgésicos, estimulantes, hormônios peptídicos e diuréticos. Nesse sentido, é evidente a necessidade de constante atualização dos profissionais que atuam em competições esportivas, bem como os profissionais de saúde que os acompanham, para evitar o risco de um uso acidental de medicamentos restritos ou proibidos. Entre essas drogas banidas pela WADA estão a SB e EF, as quais são considerados pertencentes à classe farmacêutica de estimulantes.

Além disso, a atenção também deve ser voltada à possibilidade de adulterações em suplementos alimentares e outros produtos alimentícios como as bebidas dietéticas ingeridos nos períodos antes e durante competições, como é o caso de possíveis contaminação desses produtos como a SB ou EF. Esportistas de diversas áreas vêm sendo flagrados em testes de doping devido a substâncias que estavam presentes sem serem declaradas na composição descrita no rótulo. Esses atletas receberam punições, mesmo quando a substância ingerida não melhorou o desempenho na modalidade disputada (GASPAR et al., 2012).

Van der Merwe e Grobbelaar (2005) expõe que o uso excessivo de suplementos alimentares por esportistas de alto nível é uma importante causa do crescimento de casos positivos de doping. Segundo os autores, os produtos prometem aumentar desempenho físico, são disponíveis no mercado e não passam por rigorosa fiscalização, como é o caso dos medicamentos, além de não precisarem de prescrição médica e são vendidos de forma legal, assim, alguns atletas acreditam que não contém substâncias proibidas (MERWE; GROBBELAAR, 2005).

Tendo em vista o exposto, é de essencial importância a criação e implementação de metodologias analíticas para o controle de qualidade de suplementos alimentares e bebidas dietéticas. Essas metodologias têm como finalidade apontar a dopagem não intencional de atletas pela ingestão de produtos alimentícios contaminados por substâncias proibidas. Além disso, evitar riscos à saúde das demais pessoas que ingerem tais produtos.

Outra questão a ser considerada, é a determinação dos fármacos proibidos pela WADA em fluidos biológicos, sendo essa análise importante para determinar se uma pessoa em questão fez o uso de determinada substância. Os principais fluidos analisados são o sangue e urina, onde nestes é possível a identificação e quantificação no caso da ingestão de fármacos, por meio do sinal encontrado da substância em questão ou de seus metabólitos. Todavia, esses fluídos biológicos são considerados invasivos e muitos compostos podem gerar metabólitos semelhantes aos excretados pelo corpo humano, dificultando a confirmação de um possível doping do atleta. Nesse contexto, a análise de drogas banidas pela WADA em amostras de saliva vem ganhando ênfase nos últimos tempos, devido à estabilidade,

transporte, armazenamento, facilidade de coleta e extração não-invasiva desse tipo de amostra (NUNES; MACEDO, 2013). Além disso, vários estudos mostram como se dão os mecanismos farmacocinéticos (excreção) de diversas classes de drogas em saliva, o que torna possível a identificação e quantificação de substâncias neste fluido (STRANO-ROSSI; COLAMONICI; BOTRÈ, 2008). Nesse trabalho é possível verificar a excreção de algumas drogas proibidas pela WADA na saliva humana, cuja formas dessas moléculas ainda permanecem inalteradas por algum tempo. Dessa forma, as análises de drogas em amostras de saliva pode proporcionar uma correlação entre os resultados obtidos em outros fluidos biológicos no controle de doping e, conseqüentemente, melhorar os resultados dos exames nos atletas. Além disso, devido à facilidade de coleta da amostra de saliva, um maior número de análises pode ser aplicado em vários atletas antes e durante as competições esportivas. As análises em saliva de atletas poderiam ser implementadas como testes de triagem para melhorar a eficiência e rapidez na divulgação dos resultados obtidos nos exames antidoping.

Os principais métodos analíticos aplicados para investigação de alimentos e controle de doping são notadamente realizados por métodos cromatográficos, destacando-se a cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *high performance liquid chromatography* (HPLC) com diferentes detectores tanto em amostras de produtos alimentícios (KRUG et al., 2014) quanto em fluidos biológicas (STRANO-ROSSI; COLAMONICI; BOTRÈ, 2008). Apesar desses métodos apresentarem elevada eficiência e robustez, alguns inconvenientes como geração de resíduos orgânicos, alto custo, baixa frequência analítica e alta complexidade de operação do equipamento podem ser um problema para uma aplicação de triagem de alimentos ou controle doping.

Neste contexto, novas metodologias analíticas são promissoras para análises de fármacos, a fim de contornar os inconvenientes encontrados na HPLC. Uma alternativa viável para a determinação de fármacos em amostras de produtos alimentícios e de fluidos biológicos são as técnicas eletroquímicas, que apresentam adequada sensibilidade e seletividade da análise, oferecendo ainda algumas vantagens frente aos métodos cromatográficos, como: baixo custo, portabilidade, menor geração de resíduos orgânicos, alta frequência analítica e simplicidade de aplicação. Apesar de haver diversos métodos eletroanalíticos aplicados para determinação de fármacos eletroativos em amostras de alimentos (KARASTOGIANNI; GIROUSI, 2022, SARVESTANI; AHMADI, 2018, SOLTANI; PARDAKHTY; AHMADZADEH, 2016, KHALOO et al., 2016), ainda há poucos

reportados para aplicações em controle de doping (dos SANTOS; AMIN; COMPTON, 2019, dos SANTOS; COMPTON, 2019, FREITAS et al., 2021, SOUZA et al., 2021)

Na busca de tornar os métodos eletroquímicos ainda mais simples e práticos para aplicações em análise de rotina nos laboratórios analíticos, o uso de eletrodos impressos (SPE, da sigla em inglês *screen-printed electrode*) vem se destacando nas últimas décadas em diversas aplicações analíticas (COSTA-RAMA; FERNANDEZ-ABEDUL, 2021), incluindo análises em alimentos (BADEA et al., 2019) e no controle doping (HASSO et al., 2020). Além disso, os SPE são considerados dispositivos descartáveis e oferecem vantagens como o baixo consumo de amostra (50-100 μ L) e alta portabilidade do método, sendo atualmente usados vários materiais como eletrodo de trabalho nesses dispositivos. Entre esses materiais usados nos SPE, destaca-se o de carbono grafite (SPE-Gr) devido ao seu baixo custo, boa estabilidade e simplicidade de uso. Todavia, no sentido de aumentar a sensibilidade, alguns materiais de SPE vem também sendo muito utilizados, como os de nanotubos de carbono de paredes simples e múltiplas e de grafeno.

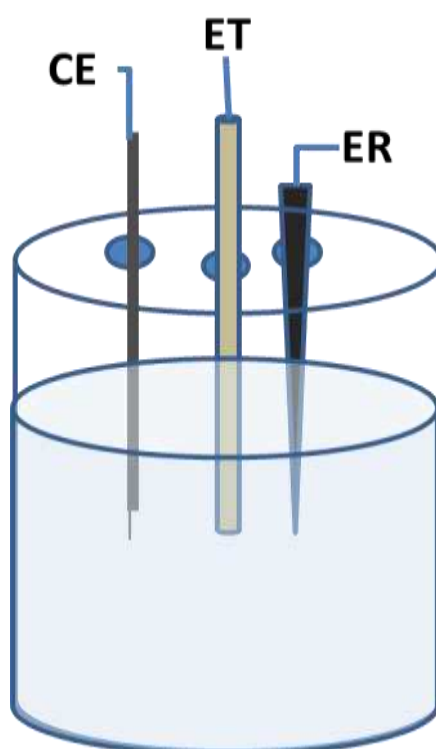
Aliado ao uso de SPE, os métodos eletroanalíticos oferecem uma diversidade de técnicas para detecção e determinação dos compostos eletroativos, sendo a voltametria uma das mais utilizadas em eletroanálise. Entre essas, a voltametria de forma pulsada vem sendo muito aplicada devido ao considerável aumento de sensibilidade dessa técnica. Associada às voltametrias, as técnicas de redissolução adsorptiva, conhecidas de forma geral pela sigla AdSV (do inglês, *adsorptive stripping voltammetry*), oferecem um aumento significativo da sensibilidade para detectar analitos que possuem transporte de massa controlados por adsorção (dos SANTOS; AMIN; COMPTON, 2019, dos SANTOS; COMPTON, 2019, KASTRATI, et al., 2020, DOMINGUEZ-RENEDO et al., 2010).

Considerando essas perspectivas, o presente trabalho propõe o uso de técnicas eletroquímicas para identificação e quantificação de SB e EF em amostras de chá e fluídos biológicos usando, pela primeira vez, um SPE com detecção por AdSV. Nos próximos tópicos, é apresentada uma breve revisão dos conceitos e trabalhos da literatura sobre as técnicas eletroquímicas utilizadas e dos SPE, bem como as características farmacológicas e métodos analíticos de determinação de SB e EF, com destaque para as amostras aplicadas de chás, saliva e urina humana.

1.2 Técnicas eletroquímicas

A expansão do número de trabalhos publicados usando metodologias eletroanalíticas nos últimos anos vem ocorrendo, principalmente, devido às suas vantagens apresentadas frente aos demais métodos de análise, como alta sensibilidade, precisão, exatidão, baixos limites de detecção e quantificação e baixos custos de análises (ZABIHOLLAHPOOR, A., 2020). As técnicas eletroanalíticas, são baseadas na interação da eletricidade com as espécies químicas e os parâmetros destas espécies podem ser relacionados com as grandezas como corrente, potencial ou carga (WANG, 1999). Uma célula eletroquímica é usada nas técnicas eletroanalíticas, que em geral, é composta por três eletrodos, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica de três eletrodos Eletrodo de trabalho (ET) Eletrodo de referência (ER) e Contra eletrodo(CE).



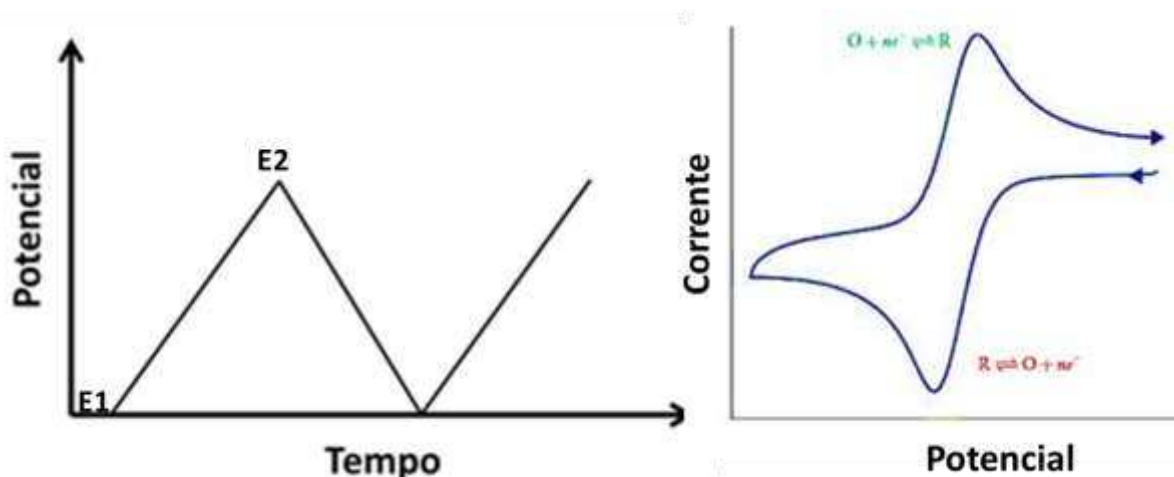
A Figura 1 mostra a configuração de uma célula eletroquímica com três eletrodos, sendo esses o eletrodo de trabalho (ET), de referência (ER) e contra eletrodo (CE), também conhecido como eletrodo auxiliar. O ET corresponde aquele no qual ocorrem as reações eletroquímicas de interesse. O potencial aplicado ao ET de trabalho para as medidas

voltamétricas é controlado em relação a um ER, cujo potencial se mantém constante. O CE completa o circuito da eletrólise. Várias técnicas eletroanalíticas estão disponíveis para realização de medidas qualitativas e/ou quantitativas, entre elas destacam-se as técnicas voltamétricas que foram usadas nesse trabalho e serão brevemente introduzidas a seguir.

1.2.1 Voltametria cíclica (VC)

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica que é muito utilizada para ensaios em que se pretende investigar o comportamento eletroquímico do(s) analito(s) de interesse. Nesta técnica pode-se conhecer as informações qualitativas sobre a termodinâmica e cinética para o estudo do processo eletroquímico de um composto eletroativo (BRETT; BRETT, 1996). A técnica de VC consiste na aplicação de potencial forma linear à velocidade constante, em função do tempo. O esquema dessa aplicação de potenciais (sinal de excitação) é mostrado na Figura 2A (TICIANELLI; GONZALEZ, 2005), sendo o gráfico gerado com esta perturbação, de corrente versus potencial, denominado voltamograma cíclico (Figura 2B).

Figura 2 - (A) Esquema do sinal de excitação na VC. (B) Voltamograma cíclico obtido pela VC para um composto eletroativo com processo eletroquímico reversível.



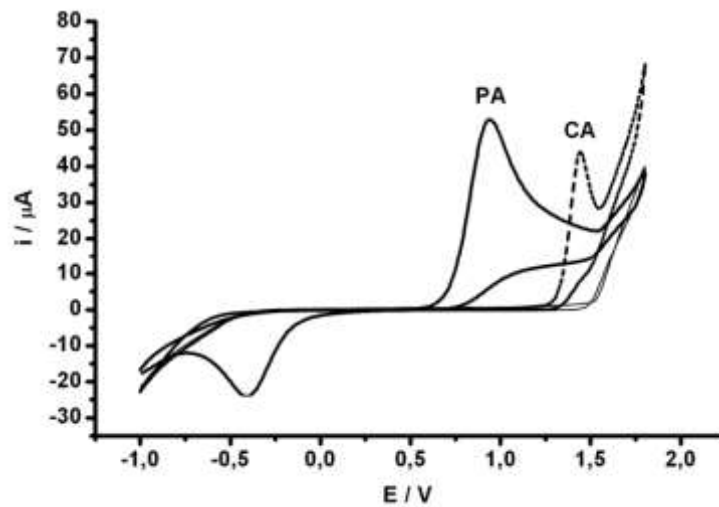
Conforme mostrado na Figura 2A, a leitura realizada no VC tem forma de um triângulo começando em um potencial de interesse escolhido (E1) indo até um segundo potencial (E2), neste potencial, a direção da varredura é invertida, podendo ir em direção ao E1, formando um ciclo, que pode ser repetido por várias vezes. A corrente medida para

carregar o ET de trabalho durante a varredura de potencial é chamada de corrente capacitiva (I_c). Quando estão presentes espécies eletroativas nessa região de potenciais estudados, reações de oxidação e/ou redução podem ocorrer na superfície de um eletrodo de trabalho (ET), gerando picos de correntes, denominadas correntes faradaicas (IF), como mostrado na Figura 2B.

Além disso, na VC a aplicação do potencial é iniciada em um determinado valor em que não há oxidação ou redução do analito. Então, a varredura de potencial pode acontecer em direção a regiões mais negativas (sentido catódico), podendo ocorrer a redução do analito, e, após, em direção a regiões mais positivas (sentido anódico), podendo ocorrer a oxidação do composto em solução, que pode ser inclusive do produto da reação anterior. Esse sentido da aplicação dos potenciais na VC pode ser realizado da forma inversa. Vale mencionar que, as IF de oxidação comumente são consideradas positivas e as de redução negativas, porém outros países, como nos Estados Unidos, utilizam esses sinais de IF da forma contrária. As correntes geradas pelas reações de redução e oxidação na interface do ET são proporcionais à concentração do analito e à velocidade da varredura (mV s^{-1}) (PACHECO et al., 2013).

O voltamograma mostrado na Figura 2B ilustra a IF para um processo eletroquímico reversível, os quais são caracterizados quando a corrente de pico anódica $I_{pa} = I_{pc}$ e a diferença do potencial de pico anódico e catódico ($E_{pa} - E_{pc}$) é de aproximadamente $59 \text{ mV}/n$, onde n é o número de elétrons envolvidos no processo eletroquímico (SKOOG, 2009) Todavia, há possibilidade do composto eletroativo apresentar processos eletroquímico quasi-irreversível ou irreversível, no ET, conforme mostra a Figura 3.

Figura 3 – VC obtido em um BDDE em solução de tampão acetato 0,1 molL⁻¹ pH 4,7 com adição de 7,5 mgL⁻¹ de paracetamol (PA) (linha contínua) e 9,6 mgL⁻¹ cafeína (CF) (linha pontilhada).



Fonte: Voltamograma extraído de dissertação de mestrado de da SILVA, 2011.

Na figura 3, podemos observar que o paracetamol (PA) apresenta um processo de oxidação quase reversível, com oxidação e redução em aproximadamente + 1,0 V e -0,5 V, respectivamente. Já a cafeína (CF) apresenta apenas um processo de oxidação irreversível em +1,5V.

Todas IF geradas pelos processos eletroquímicos (Figuras 2 e 3), dependem, além da concentração e velocidade de varredura, de vários outros fatores, onde equações são estabelecidas de acordo com a reversibilidade dos processos eletroquímicos no eletrodo de trabalho (BARD; FAULKNER, 2001). As equações 1 e 2 são apresentadas para os processos reversíveis e irreversíveis:

$$\text{Sistema reversível: } i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C_o v^{1/2} \quad (1)$$

$$\text{Sistema irreversível: } i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n)^{1/2} A D_o^{1/2} C_o v^{1/2} \quad (2)$$

onde, a intensidade da corrente de pico (i_p);

n é o número de elétrons envolvidos no processo;

A é a área do eletrodo (cm²);

C_o é a concentração da espécie em solução (mol cm⁻³);

Do é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$);

v é a velocidade de varredura (V s^{-1});

α é o coeficiente de transferência.

Neste sentido, de acordo com o tipo de reação de oxirredução que ocorre no sistema, diferentes comportamentos eletroquímicos serão observados nos voltamogramas, o que torna a VC uma importante ferramenta para o estudo de mecanismos e vários outros parâmetros da reação de oxirredução (PACHECO et al., 2013). Portanto, a técnica VC é amplamente utilizada na eletroanalítica, devido à riqueza de informações qualitativas acerca dos processos de oxirredução, incluindo detalhes sobre a cinética e a termodinâmica do sistema químico (WANG et al., 2021)

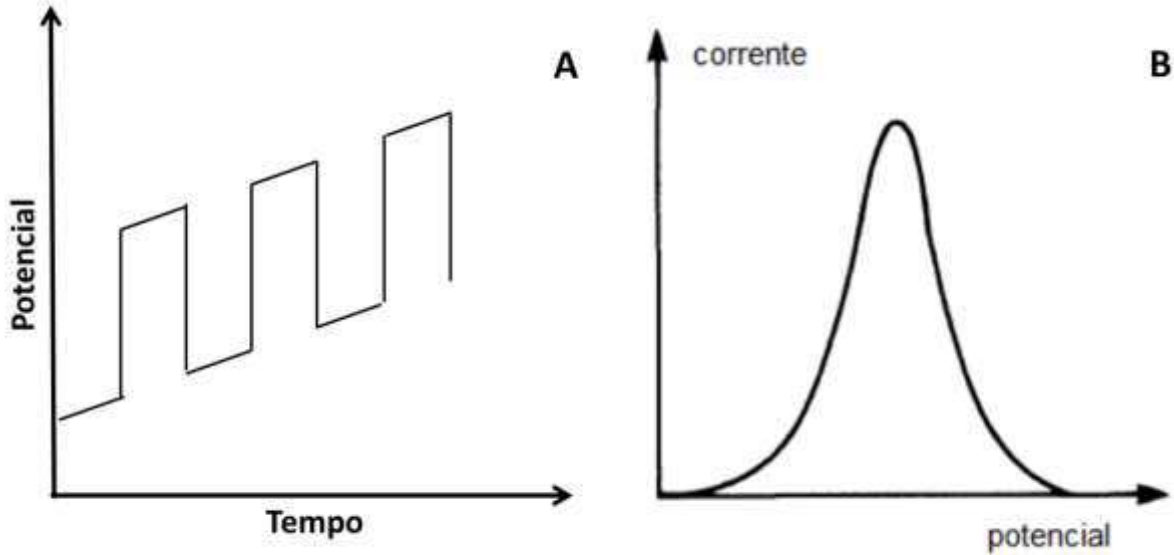
Entretanto, outras técnicas voltamétricas são mais utilizadas com intuito de quantificar os analitos, como é o caso da voltametria de pulso diferencial (DPV, da sigla em inglês differential pulse voltammetry), que foi usada neste trabalho.

1.2.2 Voltametria de pulso diferencial (DPV)

A DPV por ser mais sensível, apresenta um melhor definição e resolução dos processos eletroquímicos em relação à VC. Na DPV, a excitação do sinal no ET é baseada na aplicação de pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa crescente de potencial, como mostrado na figura 4A.

Na DPV, a corrente é medida antes da aplicação do pulso e ao final do pulso. O próprio equipamento subtrai a primeira corrente da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, como mostrado na Figura 3B. Com o voltamograma obtido, pode-se obter informações como potencial, altura, largura e área do(s) pico(s) referentes ao(s) analito(s).

Figura 4 - Esquema de excitação do sinal na DPV (A). Voltamograma resultante da excitação (B).



A DPV apresenta elevada sensibilidade (na ordem de $10^{-8} \text{ molL}^{-1}$) devido à medida ter a corrente capacitiva (corrente de fundo) minimizada. Isso ocorre, pois há uma leitura da corrente gerada no ET após um certo tempo da aplicação do pulso de potencial, diminuindo a contribuição da corrente capacitiva, uma vez que essa decai mais exponencialmente com o tempo do que a faradaica, conforme mostra as equações 3 e 4, respectivamente (WANG, 2006).

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right) \quad (3)$$

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E_{1/2} \quad (4)$$

Onde, i_p = corrente do pico (μA);

n = número de elétrons envolvido na reação redox;

F = constante de Faraday (coulombs);

A = área do eletrodo (cm^2);

t_m = tempo entre o segunda e a primeira leitura de corrente (s);

D = coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$);

C = concentração do analito (mmol L^{-1});

$\sigma = \exp(nF\Delta E / 2RT)$;

ΔE = amplitude do pulso.

Assim, escolhendo um tempo e potencial apropriados para se fazer a segunda leitura, faz-se a medida da I_F , que é proporcional à concentração do analito, como mostrado na equação 3 para DPV (WANG, 2006).

1.2.3 Voltametria de redissolução adsortiva (AdSV)

A voltametria adsortiva de redissolução, do inglês, *adsorptive stripping voltammetry* (AdSV) é uma técnica baseada na adsorção da espécie eletroativa na superfície do ET. Para tanto, é necessário que o composto eletroativo em questão apresente propriedades adsortivas com a superfície do ET. Essa adsorção pode ser considerada como uma etapa de acumulação (ou pré-concentração), gerando um ganho de sensibilidade na técnica eletroanalítica.

Na AdSV a acumulação do analito na superfície do ET é dada através de ligações covalente, de troca iônica e outras ligações eletrostáticas, não sendo baseadas em processos faradaicos. Essa adsorção pode ocorrer de forma espontânea em um eletrodo limpo ou pode haver a necessidade de modificação da superfície do eletrodo para que haja a interação (ASHOURNIA; ALIAKBAR, 2010). O processo de adsorção depende das condições da célula eletroquímica, como o eletrólito usado, material do eletrodo, transporte de massa, temperatura e tempo de acumulação. Todas essas condições devem ser avaliadas a fim de otimizar a melhor acumulação do analito na superfície do eletrodo a fim de obter uma maior sensibilidade (PACHECO et al. 2013).

Além disso, quando o analito apresenta um processo apenas difusional no ET, a técnica de redissolução pode ser considerada somente quando o produto gerado pela aplicação de um potencial é detectado após uma etapa de acumulação. A primeira condição é a forma mais comum e é aplicada para íons metálicos, conhecida pela sigla ASV (do inglês anodic stripping voltammetry), sendo o analito primeiramente reduzido e acumulado na superfície do eletrodo de trabalho e, posteriormente, oxidado e redissolvido na solução (TOH, et al., 2013). A segunda opção é dada pela técnica CSV (do inglês cathodic stripping voltammetry), onde essa é utilizada para determinar uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Na

CSV um potencial de oxidação é anteriormente aplicado para oxidar o analito e acumular o produto gerado na superfície do ET e, na sequência esse produto é reduzido e redissolvido na solução após uma varredura catódica (ALEIXO, 2018). Dessa forma, na etapa de acumulação nas técnicas ASV e CSV o potencial aplicado e seu tempo de duração devem ser otimizados para detecção do analito.

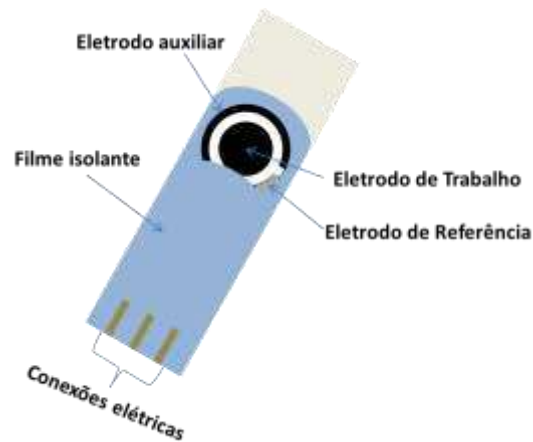
Não obstante, simultaneamente, a voltametria de redissolução pode ser adsortiva e catódica ou adsortiva e anódica, ou seja, nesses casos o composto precisa apresentar um transporte de massa controlado por adsorção no ET e também oferecer um processo de oxidação ou redução na etapa de acumulação desta técnica. Nesses dois novos casos as siglas passam a ser indicadas como AdASV (do inglês, *adsortive anodic stripping voltammetry*), e AdCSV (do inglês, *adsortive cathodic stripping voltammetry*).

De qualquer forma, a redissolução do analito pode ser feito através de uma varredura por uma técnica voltamétrica mais sensível do que a VC, como por exemplo a DPV, cuja nova sigla da técnica de redissolução vai depender da nova voltameria, sendo nesse caso dada por AdSDPV (do inglês, *adsorptive stripping differential pulse voltammetry*) quando composto apresenta apenas adsorção (ALEIXO, 2003), como foi o caso dos estudos realizados nesse trabalho.

1.3 Eletrodos impressos (SPE)

Os eletrodos impressos, do inglês *screen-printed electrode*, (SPE) são dispositivos, a princípio descartáveis, confeccionados sobre um suporte inerte, geralmente cerâmica ou PVC, neste suporte é depositado um filme que é parcialmente coberto para que haja o isolamento e definição da área ativa dos eletrodos e a área de contato elétrico. O esquema de um eletrodo impresso é mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema da configuração do SPE.



A figura 5 apresenta o esquema típico de um eletrodo impresso de 3 eletrodos em uma mesma placa de cerâmica. As dimensões do eletrodo comercial, fornecido pela Dropsens, são de 3,3 cm de comprimento por 1,0 cm de largura e uma espessura de 0,05 cm. O diâmetro do eletrodo de trabalho é de 0,4 cm (DROPSSENS, 2022).

A grande vantagem da configuração dos SPEs é que esses já contam com os três eletrodos da célula eletroquímica, os quais são colocados no mesmo suporte, favorecendo a miniaturização do sistema e uso de baixo consumo de amostra. As análises podem ser feitas colocando uma gota de solução por meio de uma micropipeta (drop-casting) sobre a superfície dos eletrodos, sendo necessário um volume em torno de apenas 50-100 μL . Os SPE acoplados a um equipamento de detecção portátil, como os mini-potenciostatos, podem facilitar a realização de análises *in loco*.

O desenvolvimento de eletrodos impressos com a tecnologia *screen printed* vem mostrando suas potencialidades devido à simplicidade de confecção e adequação a laboratórios em geral, possibilitando uma grande produção de eletrodos de baixo custo e personalizados, de acordo com as necessidades do analista (LI et al., 2012).

O processo de fabricação desses eletrodos consiste, de forma simplificada, no seguinte processo (SQUISSATO, 2019):

- (I) Sobre um substrato, que deve ser um material não eletroativo em uma ampla faixa de potencial, é feita a impressão dos contatos elétricos, usando normalmente uma tinta de prata;
- (II) É feita a impressão do ER, baseado como um pseudo-referência, com uma tinta de prata;

(III) Nesse passo, imprime-se o CE com tinta de carbono, grafite ou ouro;

(IV) É impresso o ET, que pode ser de diversos materiais, a interesse do analista;

(V) Por fim, é feita a impressão da camada isolante, para proteger os contatos elétricos do eletrodo.

A variedade de tintas comerciais de carbono possibilita a produção desses eletrodos em larga escala, e com um custo relativamente baixo dependendo do custo-benefício para suas aplicações (SQUISSATO, 2019). Com todas as vantagens supracitadas, nota-se o crescimento acentuado e quase predominante das publicações com SPEs em eletroanálise em diferentes áreas de aplicação nos últimos anos.

1.3.1 Eletrodos impressos de carbono

Uma variedade de tintas de substrato podem ser usadas na produção de SPEs, dentre estes, destacam-se os materiais de carbono grafite (SPE-Gr), principalmente, devido ao seu baixo custo e simplicidade de aplicação, além das propriedades eletroquímicas como baixa corrente de fundo e ampla faixa de potencial (WANG et al., 1996). Além disso, vários materiais de carbono, são muito utilizados para realizar a modificação da superfície de um SPE, ampliando a gama de aplicações desses dispositivos. A composição do carbono grafite no SPE-Gr varia de cada fabricante, que detém direito autoral sobre sua formulação, mas no geral, são compostas por partículas de grafite e um aglutinante de polímero. O mesmo carbono grafite impresso no ET do SPE-Gr pode ser usado no CE e ER nesse dispositivo comercial, porém também são encontrados SPE-Gr tintas impressas baseadas com metais de platina (ou Ouro) no CE e de prata no ER (WANG et al., 1998).

No sentido de aumentar a sensibilidade, alguns materiais de SPE vem também sendo muito utilizados, como os de nanotubos de carbono de parede simples e múltiplas, além do grafeno. Esses eletrodos apresentam a construção similar ao SPE-Gr, como mostrado na Figura 5, sendo que têm a mesma dimensão além de ER e CE igual, o que varia é só o material do ET.

Por apresentarem propriedades de superfície diferentes, esses materiais foram testados a fim de avaliar qual favorecia o melhor sinal analítico dos fármacos. O custo benefício também foi levado em consideração nessas análises.

1.4 Contaminação e adulteração de suplementos alimentares

Os suplementos alimentares, como chá naturais, vêm sendo cada vez mais usados pela população em geral e também atletas (da COSTA et al., 2021). Quem faz o uso desse gênero alimentício, busca uma complementação da dieta, visto que são ricos em substâncias que possuem efeitos nutricionais e fisiológicos. Por serem alimentos, os suplementos, mesmo contendo uma série de substâncias, não passam controle de qualidade rigoroso, como no caso dos medicamentos. No Brasil, somente em 2018 foi criada uma categoria específica de regulamentação para os suplementos alimentares, com a RDC 243/2018 (Brasil, 2018).

No entanto, existem relatos na literatura de contaminação desses com substâncias com propriedades farmacológicas, como é o caso dos estimulantes (GEYER et al., 2011). Entre esses estimulantes a SB e EF já foram encontrados como contaminantes em chá chinês LiDa, e chá de *Camellia sinensis*, respectivamente (JUNG; HERMANNNS-CLAUSEN; WEINMANN, 2006, de HON; COUMANS, 2007).

Além disso, agência reguladora de doping, WADA, no esporte dispõe que é uma obrigação do próprio atleta garantir que nenhuma substância listada como proibida, bem como seus metabólitos ou marcadores, esteja presente em seu organismo. Assim, mesmo se a substância proibida não estiver listada nos ingredientes deste suplemento, o atleta que o consumiu poderá sofrer sanções (WADA). Estudos realizados por Tscholl e colaboradores mostram que atletas em competições mundiais de atletismo fazem o uso de, em média, 1,7 suplementos. No entanto, muitas vezes os consumidores não têm conhecimento da composição do suplemento, do mecanismo de ação, dose recomendada, possibilidade de contaminação com outras substâncias e nem que estes podem ter efeitos colaterais (TSCHOLL et al., 2010).

Dessa forma, o uso indiscriminado desses suplementos, como os chás naturais, pode ocasionar vários efeitos indesejáveis, como um possível doping não intencional dos atletas em competições esportivas. Algumas dessas bebidas de chá naturais já possuem relatos de contaminação com estimulantes, como no caso da contaminação do chá dietético de *Camellia sinensis* com 1,3-dimethylbutylamine (DMBA). No trabalho, os autores relatam encontrar uma quantidade de 0,1 a 214 mg do estimulante nas doses diárias dos suplementos, o que pode ocasionar doenças cardíacas nos consumidores (AVULA et al., 2015). Outro caso exposto na literatura foi do chá chinês LiDa, o qual uma jovem, que fez o consumo por uma semana, apresentou alguns efeitos colaterais, como uma forte dor de cabeça. Após a análise

do fototerápico e da urina da paciente, foi encontrada a quantidade de 27,4 mg de SB por dose consumida, o que é o dobro da dose máxima recomendada (JUNG; HERMANNSCLAUSEN; WEINMANN, 2006).

Um estudo realizado por de Hon e Coumans, relata que a análise de suplementos consumidos pelos atletas da Holanda que participariam da Salt Lake City no ano seguinte. Os resultados demonstraram que, dos 69 suplementos testados, 13 (19%) continham substâncias dopantes que não estão listadas no rótulo, dentre esses encontrou-se EF como contaminante (de HON; COUMANS, 2007). Portanto, nota-se uma grande necessidade de controle de qualidade desses suplementos alimentares, de forma a impedir contaminações acidentais com outras substâncias.

1.5 Controle doping em saliva e urina humana

A urina é um fluido biológico muito utilizado para teste de doping em atletas. Isso se deve principalmente pela relativa grande quantidade de substâncias excretadas por essa via de forma inalterada, facilitando os testes. Sua composição é uma mistura aquosa de ureia e outras substâncias químicas orgânicas e inorgânicas. Destaca-se, entre essas substâncias, grandes quantidades de ácido úrico, ácido ascórbico e creatinina. Pode haver grandes alterações na composição do fluido por fatores como doenças, atividades físicas e consumo de medicamento e diuréticos (GUYTON, 1988). É relatado na literatura, atletas que são flagrados em testes *antidoping* devido a presença de EF em amostras de urina. Esse fármaco é excretado, de forma inalterada, de 60-77% da sua dose ingerida, sendo assim, a grande quantidade presente facilita as análises (COLOMBELI, 2006). Já a SB é quase 100% metabolizada e eliminada por meio dos seus metabólitos M1 e M2 (TOZER; ROWLAND, 2009)

Outro fluido biológico que permite análises de doping simples e menos invasiva é a saliva. Sua coleta, feita por meio de um salivete é rápida e permite seu armazenamento de forma segura (MOURA et al., 2007). A composição da saliva é menos complexa, se compararmos ao sangue ou urina, sendo composta basicamente de cerca de 99% de água e 1% uma mistura de substância orgânicas presentes no muco bucal como ácido ascórbico e ácido úrico e substâncias inorgânicas, como íons de sódio, potássio, fosfato, cloreto, dentre outros (SCHÜTZEMBERGER et al., 2007).

Ambas as matrizes de amostra citadas, possuem interferentes muito conhecidos na eletroanalítica – o ácido ascórbico e ácido úrico – em grandes quantidades. No entanto, para

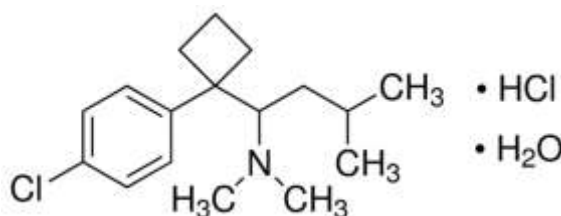
análises voltamétricas essa interferência só é significativa se o potencial de pico do analito coincidir (ou ser próximo) com o potencial de pico desses ácidos. Dessa forma, é viável a análise de SB em chás e de EF em chás e fluidos biológicos.

1.6 Características dos analitos investigados e seus métodos de determinação

1.6.1 Sibutramina (SB)

A SB é um fármaco pertencente à classe dos inibidores de receptação de noradrenalina, serotonina e dopamina no sistema nervoso central, sendo utilizada no tratamento de pacientes com obesidade através da diminuição da ingestão de alimentos e maior gasto energético. O composto SB é uma mistura racêmica dos enantiômeros (+) e (-) do cloridrato de 1-(4-clorofenil)-N,N-dimetil- α -(2-metilpropil)-ciclobutanometanamina monoidratado, cuja sua estrutura é mostrada na Figura 6 na sua forma de sal monohidratado.

Figura 6 - Estrutura molecular do Cloridrato de Sibutramina monohidratado.



A SB apresenta extensa metabolização de primeira passagem, sendo praticamente toda transformada em metabólitos farmacologicamente ativos M1 (mono-desmetil) e M2 (di-desmetil), os quais atingem concentração máxima em três horas para a administração de 20 mg do fármaco (TOZER; ROWLAND, 2009). A via de eliminação preferencial da SB e de seus metabólitos M1 e M2 é através do fígado, pela ação de isoenzimas CYP3A4 do sistema citocromo P450 (MASSONI; SUYENAGA, 2012). As propriedades físico-químicas da SB são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades Físico-Químicas do Cloridrato de Sibutramina

Fórmula Molecular	$C_{17}H_{26}ClN \cdot HCl \cdot H_2O$
Massa Molar	334,32 $gmol^{-1}$
Ponto de fusão	191,5 °C
Solubilidade	2,9 $mgmL^{-1}$
pKa	9,77
Descrição	Pó cristalino branco

Fonte: Sigma Aldrich

Apesar de sua eficácia no tratamento de pacientes obesos, a SB pode apresentar alguns efeitos colaterais, sendo os relacionados ao sistema cardiovascular os mais comuns e graves, sendo eles taquicardia, palpitações, aumento da pressão arterial e vasodilatação. Sendo assim, uma atenção redobrada no doseamento do fármaco é essencial para garantir que não haja sobredosagem nas formulações, o que agravaria ainda mais esses efeitos colaterais.

Outro ponto que deve ser levado em consideração é a possível adulteração com SB em bebidas dietéticas como em chás naturais, sem este fármaco constar no rótulo, levando a uma possível ingestão não controlada que pode resultar em danos à saúde do consumidor dessas bebidas. Além disso, a SB é um estimulante proibido a atletas pela WADA, sendo que seu consumo antes ou durante competições caracteriza-se como doping.

Dessa forma, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos para determinação de SB em bebidas de chá. Apenas alguns métodos são encontrados na literatura para determinação da SB em chás. Um deles utiliza a técnica espectroscópica ATR-FTIR combinada com quimiometria (CEBI; YILMAZ; SAGDIC; 2017). O outro método que determina SB nessas amostras é baseado em cromatografia líquida combinada com espectrometria de massas (KOEHLER et al., 2007).

No sentido de utilizar métodos mais rápidos e de baixo custo, técnicas eletroanalíticas também vêm sendo reportados para a determinação de SB em bebidas dietéticas. Carvalhos e colaboradores utilizaram um eletrodo de mercúrio de gota pendente na determinação de SB em amostras de bebidas energéticas e chá verde com a DPV em meio de um tampão McIlvaine pH 4,0 (CARVALHO et al., 2012). Outra determinação da SB em amostras de chás dietéticos foi feita por meio da detecção voltamétrica usando um filme de micropartículas de compostos antioxidantes depositado na superfície de um eletrodo de carbono vítreo (MARTINI et al., 2015). Por último, além desses ET, o eletrodo de diamante dopado com boro com voltametria de onda quadrada em meio de H_2SO_4 0,1 $molL^{-1}$ foi

proposto para a determinação e quantificação da SB em suplementos alimentares (FREITAS et al., 2019).

Apesar desses métodos eletroanalíticos propostos serem eficientes para a determinação de SB em amostras de bebidas dietéticas, nenhum método reportado havia feito o uso de eletrodos descartáveis como o caso dos SPE-Gr, que é proposto neste trabalho. Dessa forma, os métodos eletroquímicos utilizando SPE podem oferecer vantagens frente os demais ET reportados, como maior portabilidade e miniaturização dos sistemas eletroquímicos, tornando ainda mais simples e aplicáveis a determinação da SB em amostras de bebidas de chá. Além disso, o uso de uma técnica voltamétrica mais sensível, como é o caso da AdSV proposta nesse trabalho, pode melhorar ainda mais a sensibilidade na determinação de SB. Portanto, o presente trabalho vem propor uma nova metodologia eletroanalítica para determinação de SB em de chás dietéticos baseado no uso de um SPE-Gr com detecção por AdSDPV.

1.6.2. *Efedrina (EF)*

A EF é um alcaloide simpatomimético derivado de plantas do gênero *Ephedra*, sendo utilizada para diversas finalidades terapêuticas, entre elas, o tratamento de asma brônquica, condições alérgicas como urticária e hipotensão. A EF é também um antagonista nos receptores α e β e intensifica a liberação de norepinefrina nos neurônios simpáticos. A Figura 7 mostra a estrutura molecular do sal de cloridrato de EF, sendo suas propriedades físico-químicas apresentadas na tabela 2.

Figura 7- Estrutura molecular do cloridrato de efedrina.

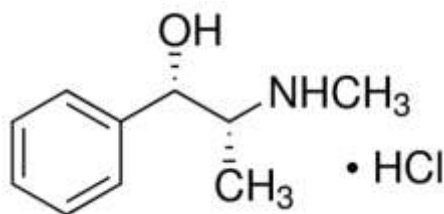


Tabela 2: Propriedades Físico-Químicas da Efedrina.

Fórmula Molecular	$C_6H_5CH(OH)CH(CH_3)NHCH_3 \cdot HCl$
Massa Molar	201,69 g mol ⁻¹
Ponto de fusão	191,5 °C
Solubilidade	5% em H ₂ O
pKa	9,65
Descrição	Pó branco

Fonte: Sigma Aldrich

A EF consumida por via oral apresenta grande biodisponibilidade, sendo que seu efeito permanece por várias horas. Sua principal forma de eliminação é pelos rins, onde grande parte é excretada de forma inalterada, tendo tempo de meia vida de 3 a 6 horas (GOODMAN; GILMAN, 2005). Apesar de apresentar vários fins terapêuticos, o uso de EF tornou-se restrito por haver dúvidas quanto ao seu perfil de segurança. Além disso, o fármaco apresenta efeitos colaterais como hipertensão arterial, taquiarritmias, infarto do miocárdio e morte súbita, sendo esses efeitos ainda mais preocupantes em pacientes cardiopatas (FORTE et al., 2006).

Além dos fins terapêuticos supracitados, a EF é muito usada em suplementos alimentares com a finalidade de maior gasto energético e consequente perda de peso. Alguns estudos mostram que a perda de peso ocorre apenas em curto prazo (RASCOVSKI et al., 2000). Suplementos contendo EF são proibidos no Brasil, mas são comprados ilegalmente em academias e internet. A WADA também proíbe o uso deste fármaco por atletas antes e durante competições esportivas, caracterizando-o como um psicoestimulante.

Portanto, além da suma importância das análises para controle de doping de EF em fluidos biológico, o desenvolvimento de métodos para a determinação de EF em amostras alimentícias são também essenciais para garantir que os produtos não sofreram contaminações e adulterações. Inúmeras metodologias são encontradas na literatura para a determinação de EF, incluindo HPLC-UV, Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS), eletroforese capilar, espectrofotometria, espectrofluorimetria e métodos eletroquímicos (QIONG et al., 2017; NARIMANI, DALALI, ROSTAMIZADEH, 2014; DENG et al., 2014; MOUSTAFA et al., 2018; CHICHARRO et al., 1993).

Dentre estes, destacam-se os métodos eletroquímicos, devido à sua simplicidade, relativo baixo custo, rapidez das análises e baixa geração de resíduos para determinação de EF. Bagheri e colaboradores apresentaram um método eletroanalítico para determinação de EF em amostras biológicas e em formulações farmacêuticas, utilizando um sensor com

nanocompósito Fe₃O₄@ SiO₂@TiO₂-MIP em meio a tampão Britton-Robinson pH 10,5, (BAGHERI et al., 2016). Outro método para determinação de EF em urina e formulações foi proposto por Ahmar e Fakhari usando a AdSDPV com eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, em meio de soluções de sais de fosfato (KH₂PO₄, K₂HPO₄) pH 12 (AHMAR, H.; FAKHARI,2012)

Novamente, embora esses métodos eletroanalíticos para determinação de EF tenham apresentado uma boa eficiência, esses trabalhos utilizam eletrodos modificados, que pode ser um inconveniente para aplicação do método em análises de rotina e triagem da EF. Dessa forma, novas propostas ainda podem melhorar a aplicação da eletroanálise de EF em suplementos alimentares e fluídos biológicos. Nesse contexto, o presente trabalho vem propor uma nova metodologia eletroanalítica com o uso do SPE-Gr com detecção por AdSDPV para determinação da EF em suplementos alimentares, saliva e urina humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos usando dispositivos simples baseados no SPE-Gr com uma detecção sensível e seletiva por AdSDPV dos estimulantes SB e EF, buscando aplicações para avaliar contaminação de alimentos em amostras de chás e no controle de doping em amostra de saliva e urina.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o comportamento eletroquímico da SB e da EF por meio da voltametria cíclica em diferentes pHs, otimizando a escolha do eletrólito suporte;
- ✓ Otimizar parâmetros de detecção pela técnica de AdSDPV, como o incremento de potencial, amplitude de pulso e tempo de acumulação dos analitos;
- ✓ Avaliar o melhor custo benefício de diferentes SPE de carbono para determinação de SB e EF;
- ✓ Investigar todos os parâmetros analíticos para determinação de SB e EF;
- ✓ Realizar estudos de adição e recuperação da SB e EF nas amostras de bebidas de chás para aplicação do método proposto na análise de contaminação de alimentos
- ✓ Realizar estudos de adição e recuperação de EF também em amostras de saliva e urina para aplicação do método proposto no controle de doping.
- ✓ Comparar os resultados obtidos métodos com os métodos previamente reportados.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes, soluções e amostras

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada com resistência superior a 18,2 MΩ cm obtida de um sistema de purificação Mili-Q. plus (Millipore) e os reagentes utilizados foram de grau analítico. Como eletrólitos suporte foram estudados soluções de tampão Britton-Robinson (TBR) entre pH de 2 a 12 com a força iônica corrigida (FATIBELLO, 2016) a 0,1 mol L⁻¹, as quais foram preparadas através da mistura de volumes adequados de soluções à 1g L⁻¹ de: Hidróxido de sódio (Alphatec), ácido acético (Merck), ácido fosfórico (Vetec), ácido bórico (Merck) e cloreto de potássio (Merck). Foram utilizados também os tampões: fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7) preparado através da dissolução do sal de fosfato monobásico de potássio (Vetec); e borato 0,1 mol L⁻¹ pH 10 preparado através da dissolução ácido bórico. Todos os tampões investigados como eletrólito foram dissolvidos em água e o pH corrigido com uma solução concentrada de NaOH até o valor desejado.

Soluções estoque de 1x10⁻² mol L⁻¹ de SB e EF (Sigma-Aldrich) foram preparadas através da pesagem da massa adequada de cada substância e diluídas para 10 mL de água deionizada utilizando-se um balão volumétrico. Essas soluções foram armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração. No momento da análise, as soluções estoque foram diluídas à concentração desejada no eletrólito suporte a ser estudado.

3.2 Preparo das amostras de chá dietético

Amostras de chás dietéticos foram adquiridos nas drogarias locais da cidade de Diamantina-MG.

Os chás na forma de sachê tinham as seguintes composições:

- ✓ Marca A: Folhas de Erva Mate (*Ilex paraguariensis*), gengibre (*Singer officinalis L. Rosco*), boldo (*Pneumus boldo*), folhas e ramos de hortelã (*Mentha piperita*);
- ✓ Marca B: Folhas e brotos de chá verde (*Camelia sinensis*);
- ✓ Marca C: Chá verde (*Camelia sinensis*), Carqueira (*Baccharis trimera*), Erva Mate (*Ilex paraguariensis*), Hortelã (*Mentha piperita*), Gengibre (*Singer officinalis L. Rosco*), Guaraná (*Paullinia cupana*), Salvia (*Salvia officinalis*) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*);

Os chás na forma de ervas trituradas tinham as seguintes composições:

- ✓ Marca D: Camomila (*Chamomilla recutita* L.), Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), Guaraná (*Paullinia cupana*), Chá verde (*Camelia sinensis*) e Gengibre (*Singer officinais* L. Rosco).
- ✓ Marca E: Mate verde (*Ilex paraguariensis*), Carqueja (*Baccharis trimera*), Hortelã (*Mentha piperita*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Canela (*Cinnamomum verum*), Chá verde (*Camelia sinensis*), Gengibre (*Singer officinais* L. Rosco) e Sálvia (*Salvia officinalis*).

Figura 8 – Embalagens dos chás dietéticos utilizados



Os chás adquiridos tinham forma de sachê e ervas trituradas, e foram preparados de acordo com as orientações do rótulo: (I- Sachê) Aquecer 200 mL de água e imergir o sachê na água por 5 minutos. Após este preparo, esperou-se o chá atingir temperatura ambiente. (II- Ervas trituradas) Colocar duas colheres de sopa das ervas em um filtro de papel e imergi-lo em 1 L de água fervida. Aguardar 15 minutos e esperar atingir a temperatura ambiente. Após o preparo, procedeu a sua diluição de cada chá dez vezes no eletrólito de interesse.

3.3 Preparo da amostra de urina

Para a preparação das amostras de urina, foram coletados 50 mL de urina em um recipiente adequado de um paciente voluntário e saudável, sem que este tivesse administrado qualquer medicação antes nos dias anteriores a coleta. Em seguida uma alíquota de 1 mL de amostra da urina foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com eletrólito, obtendo o fluido biológico diluído em 10 vezes. As amostras de urina foram então dopadas com quantidades pertinentes de EF para a análise.

3.4 Preparo da amostra de saliva

A saliva de um paciente voluntário e saudável foi coletada com a ajuda de um salivette (Sarstedt), conforme mostra a Figura 9.

Figura 9 - Salivette com rolo de algodão de tampa azul de pressão, com etiqueta de papel.



O salivette utilizado tinha as dimensões de 97 mm de comprimento e diâmetro de 16,8 mm. O algodão contido no salivette foi colocado na boca do paciente e deixado por 2 a 3 minutos. Após esse tempo foi feita a centrifugação do frasco de coleta por 2 minutos à 2000 rpm. A amostra coletada foi então diluída 10 vezes com o eletrólito de interesse, e posteriormente dopada com a EF em diferentes concentrações.

3.5 Instrumentação

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato μ Autolab type III (Metrohm - Eco Chemie) acoplado a um microcomputador com o software GPES 4.9 (Metrohm). Os estudos voltamétricos foram todos realizados com eletrodos impressos de carbono (Dropsens), sendo eles o eletrodo de grafite (SPE-Gr), de grafeno (SPE-Gf), de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (SPE-CNT).

Todos estes eletrodos mostrados na Figura 10 são configurados numa célula eletroquímica de 3 eletrodos, sendo o ET de acordo com cada matéria supracitado, todos com área geométrica de $4,0 \text{ mm}^2$. Todos esses SPE também são compostos por um eletrodo de pseudo-referência constituído por uma tinta de prata e um eletrodo auxiliar de platina. Todos SPE foram condicionados por VC no eletrólito suporte antes de todas análises por 10 ciclos de $-1,0$ a $+1,2 \text{ V}$ a 100 mV s^{-1} . As análises foram realizadas acoplando-se a placa de eletrodos impressos ao conector d SPE da Dropsens (mostrado na imagem da Figura 10) e adicionando-se uma gota do analito por meio de *drop-casting* com uma micropipeta sobre a superfície dos eletrodos ($\sim 100 \mu\text{L}$), cobrindo os 3 eletrodos no SPE para detecção eletroquímica (Figura 10).

Figura 10 - Imagem do sistema de detecção no SPE por adição *drop-casting* para eletroanálise.



A Figura 10 mostra a ponteira de uma micropipeta direcionada à superfície dos eletrodos. Um volume de $100 \mu\text{L}$ de solução de interesse é depositada diretamente sobre os eletrodos, é suficiente para cobrir os três (ET, ER e CE). Após ser adicionada é aguardado o tempo de pré-concentração (se for o caso) e depois é realizada a análise voltamétrica. Após o

procedimento, a gota pode ser retirada e os eletrodos lavados para uma nova utilização ou descartados.

3.6 Comportamento eletroquímico dos fármacos

O comportamento eletroquímico da SB e da EF foi estudado por VC numa janela de potenciais de -1,0 a 1,2 V à velocidade de 50 mVs⁻¹ em tampão Britton-Robinson 0,1 molL⁻¹ numa faixa de pH de 2,0 a 10,0.

Após a escolha do pH do eletrólito, foi feito o estudo de outros tampões neste mesmo pH. Além disso, estudou-se diferentes ET no SPE a base de carbono buscando o melhor comportamento de seletividade e sensibilidade frente à espécie eletroativa.

Outro estudo realizado foi a variação de velocidades de varredura na VC, onde foram avaliadas as velocidades de 10 a 150 mVs⁻¹ afim de descobrir se o transporte de massa do analito até o ET no SPE é controlado por difusão ou por adsorção.

3.7 Parâmetros de otimização da DPV

Os parâmetros da técnica de detecção DPV foram avaliados em função de uma maior relação corrente/ largura de meia altura do pico do fármaco, com o objetivo de obter uma maior sensibilidade aliada a uma maior resolução de pico. O primeiro parâmetro avaliado foi o incremento (step) de potencial, que está diretamente correlacionado com a velocidade de varredura na DPV, cujo valor foi equivalente a 10 vezes o valor do step estudado, que foi variado numa faixa de 1 a 10 mV. A amplitude de potencial também foi avaliada numa faixa de 5 a 100 mV, já tendo fixado o step escolhido.

Outro estudo foi realizado para determinar o melhor tempo de acumulação da SB e EF, neste estudo, uma solução do fármaco a uma concentração de 1x10⁻⁴ molL⁻¹ é adicionada na superfície do eletrodo, é medido o tempo de acumulação antes da detecção agora por AdSDPV. Os sinais obtidos em diferentes tempos de acumulação foram avaliados e comparados, buscando atender a sensibilidade necessário com menor tempo possível para análise.

3.8 Otimização dos parâmetros analíticos

Com os parâmetros da técnica de detecção otimizados por AdSDPV, foram realizados estudos para verificar a repetibilidade e reprodutibilidade da metodologia desenvolvida, sendo avaliados os desvios padrão relativos (DPRs) dos sinais de corrente de 10 análises consecutivas de cada fármaco com concentração $1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ no mesmo ou em diferentes SPEs. Foram feitos posteriormente estudos para a obtenção da faixa linear de trabalho, que foi estabelecida através da curva de regressão linear. A regressão foi feita através das médias das correntes de pico dos voltamogramas de diferentes concentrações em triplicata de solução padrão de cada fármaco da menor concentração detectada até a concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$.

Para o cálculo do limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) teóricos (ALLEGRI; OLIVIERI, 2014), foram feitos dez voltamogramas por AdSDPV do eletrólito otimizado, sendo medida a corrente no potencial de pico do fármaco em questão (SB ou EF). Posteriormente, foi calculado o DPR para as dez correntes obtidas do eletrólito (branco). O cálculo do LOQ teórico foi calculado multiplicando por três o DPR obtido e dividindo o valor pelo coeficiente angular da regressão de cada fármaco. O mesmo cálculo foi feito para calcular o LOQ limite de quantificação, diferenciando-se apenas no fato de que o desvio padrão dos ruídos foi multiplicado por 10.

Os estudos de adição e recuperação dos analitos (SB ou EF) foram realizados em diferentes amostras, todas diluídas dez vezes no eletrólito, são elas: chás dietéticos, saliva e urina. Nessas amostras foram adicionadas uma quantidade conhecida de padrão de SB (chá) ou EF (saliva, urina e chás dietéticos), sendo o sinal eletroquímico obtido comparado ao sinal desta amostra sem os respectivos analitos. O percentual de recuperação foi então obtido para cada analito.

4 RESULTADOS

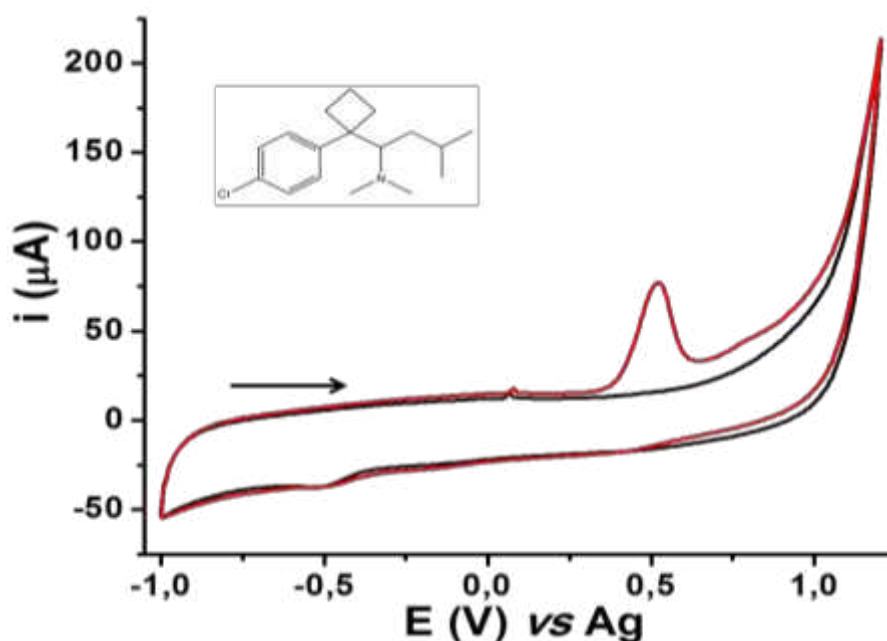
Os resultados apresentados no desenvolvimento de dois métodos eletroanalíticos usando SPE e detecção por AdSDPV serão divididos em dois capítulos. No primeiro, serão mostrados os resultados do para determinação de SB em amostras de chás dietéticos. No segundo, são apresentados os resultados preliminares de uma proposta para determinação de EF em bebidas de chá e amostras de saliva e urina humana.

4.1 Determinação da SB em amostras em chás dietéticos

4.1.1 Comportamento eletroquímico da SB

A VC foi utilizada para investigar o comportamento eletroquímico da SB em toda a faixa de potencial possível pelo SPE-Gr, de -1,0 a 1,2 V (vs Ag/AgCl) em diferentes pHs e eletrólitos, sendo inicialmente apresentado os resultados em meio de TBR na Figura 11.

Figura 11 - VCs em TBR $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 em SPE-Gr (linha preta) com adição de $0,5 \text{ mM}$ de SB (linha vermelha). Na inserção a estrutura da molécula de SB é apresentada. Todas as varreduras de potenciais foram iniciadas em $-1,0 \text{ V}$ na direção positiva, com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} .

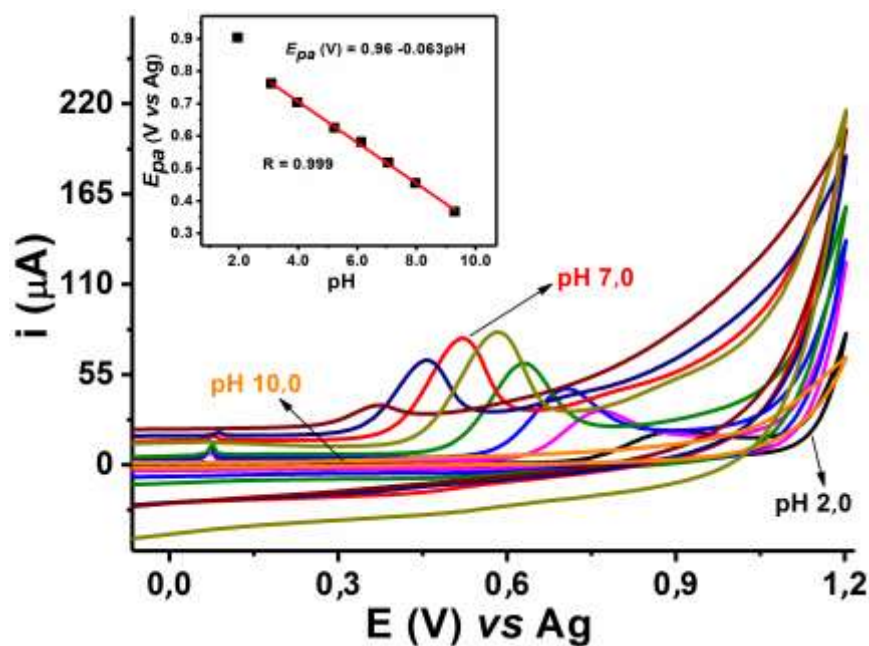


A Figura 11 mostra que SB no SPE-Gr, em meio de TBR pH 7,0, apresentou um processo de oxidação com pico de corrente bem definido em $+0,52 \text{ V}$ (vs Ag), além da evidência de um outro processo anódico em $+0,80 \text{ V}$, porém destacado apenas com um ombro

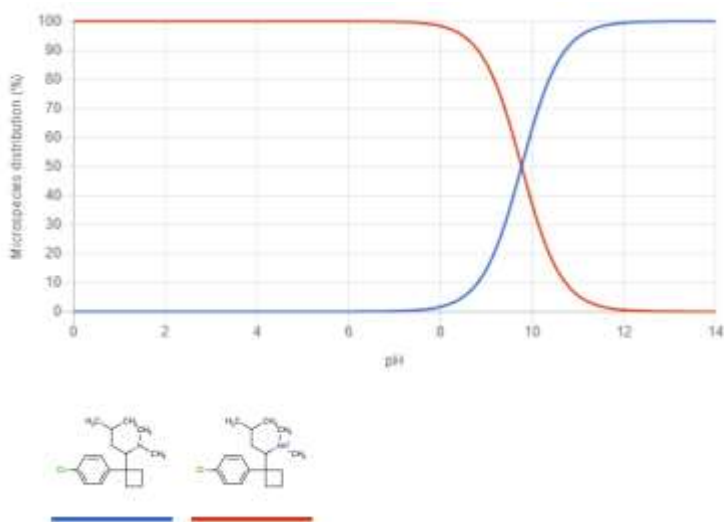
de corrente. Esse possível processo de oxidação em +0,8 V também não é reprodutivo, não sendo observado em todas as análises realizadas usando SPE-Gr. Cabe ainda mencionar que, o processo de redução em torno de -0,5 V (*vs* Ag) mostrado nos voltamogramas do eletrólito, sem e com adição de SB, na Figura 11 é devido a presença de oxigênio na solução. Esse processo redução foi recorrente, mesmo após a remoção do oxigênio desta solução antes das análises. Todavia, devido ao procedimento adotado para análise no SPE-Gr via *drop-casting* da solução, após adição da gota no SPE o oxigênio pode ser redissolvido gerando o seu processo de redução no ET. Além disso, é notado na Figura 11 que a janela de potencial usada atingiu a descarga do solvente no SPE-Gr, provocando a formação de oxigênio na solução pela oxidação da água, o que de fato pode contribuir para formação do processo de redução verificados nesses voltamogramas. Devido aos problemas supracitados, esse processo de redução do oxigênio também foi apresentado em outros estudos neste trabalho.

O mesmo comportamento eletroquímico da SB mostrado na Figura 11 foi observado usando eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*) sem e com modificação de grafeno em meio de tampão BR pH 8,0 (TERADAL, NARAYAN, JALADAPPAGARI, 2013). Freitas e colaboradores também observaram o primeiro processo oxidação da SB em um eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE, do inglês *boron-doped diamond electrode*) em meio a H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , que atribuíram à oxidação da amina terciária da molécula de SB com perda de um elétron e um próton (FREITAS et al., 2019). Essa dependência de prótons no processo de oxidação da SB no SPE-Gr também foi constatada e é mostrada na Figura 12 pelo estudo realizado em TBR de pH 2,0 a 10,0.

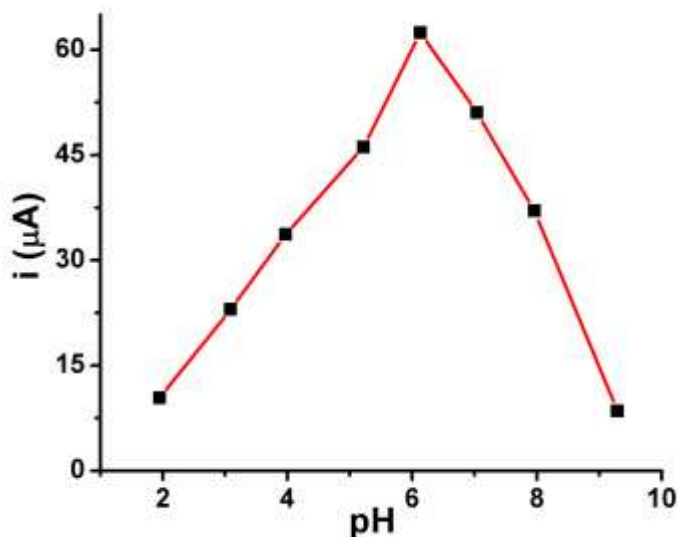
Figura 12 - VCs em diferentes pHs (2,0 a 10,0) em tampão BR 0,1 M com adição de 0,5 mM de SB. Todas as varreduras potenciais foram iniciadas em 1,0 V na direção positiva, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Na inserção e apresentada a relação e regressão linear obtida entre E_{pa} vs pH do primeiro processo de oxidação da SB no SPE-Gr.



Na Figura 12 é notado de fato que o primeiro processo de oxidação da SB no SPE-Gr é de dependente do pH, não sendo este observado em pH 10. Cabe destacar que a SB torna-se muito menos solúvel em meio básico devido à sua molécula estar desprotonada no seu grupo amina (pK_a 9,8) a partir de pH 8,0, conforme mostra a Figura 13 referente ao gráfico de distribuição das suas espécies em função do pH (CHEMICALIZE, 2022).

Figura 13 - Distribuição da molécula de SB em diferentes pHs.

De acordo com gráfico de distribuição da SB mostrado na Figura 13 (CHEMICALIZE, 2022), é possível notar que a molécula de SB está sempre na forma protonada até pH 8,0, sendo totalmente desprotonada em pH 11,0. Assim, devido a essa distribuição de pH da SB e seu comportamento eletroquímico apresentado na Figura 12, é possível sugerir que o processo de oxidação da SB é de fato mais favorável quando essa molécula está protonada no seu grupo amina. Esse fato pode ser corroborado avaliando a I_{pa} da SB em função do pH mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Relação entre I_{pa} obtidas na Figura 12 em função do pH para o primeiro processo de oxidação da SB no SPE-Gr.

A Figura 14 mostra um aumento significativo da I_{pa} da SB no SPE-Gr de pH 2 a 6 e, posteriormente, de mesma magnitude em pHs básicos. Esse aumento de I_{pa} da SB pode estar relacionado a um possível aumento do coeficiente de difusão dessa molécula à medida que os ácidos do TBR (acético e fosfórico) estão sendo desprotonados na célula eletroquímica. Por outro lado, esse aumento do coeficiente de difusão é limitado a solubilidade da SB em meio básico, bem como pela desprotonação da molécula de SB a partir de pH 8,0 (Figura 13). Cabe ainda mencionar que, apesar de não ter sido observado nenhuma I_{pa} para o processo de oxidação da SB no SPE-Gr em $pH \geq 10,0$ (Figura 12), não se pode descartar a possibilidade de uma rota de oxidação da molécula de SB desprotonada em meio básico. Isso porque, a visualização de um processo de oxidação para molécula SB totalmente desprotonada pode estar sendo impossibilitada devido a sua baixa solubilidade em água no meio básico.

No que tange ao ombro do segundo processo de oxidação da SB no SPE-Gr mostrado em pH 7,0 (Figura 11), este não foi nitidamente exibidos em todos pHs avaliados no TBR (Figura 12). Sendo assim, apenas a relação do E_{pa} vs pH do primeiro processo de oxidação da SB no SPE-Gr foi avaliada, conforme apresentado na inserção da Figura 12. Esse E_{pa} da SB foi linearmente proporcional ao pH (inserção da Figura 12) no SPE-Gr na faixa de pH 3.0 a 9.0 ($r^2 = 0,999$) com a respectiva equação 5 de regressão linear obtida:

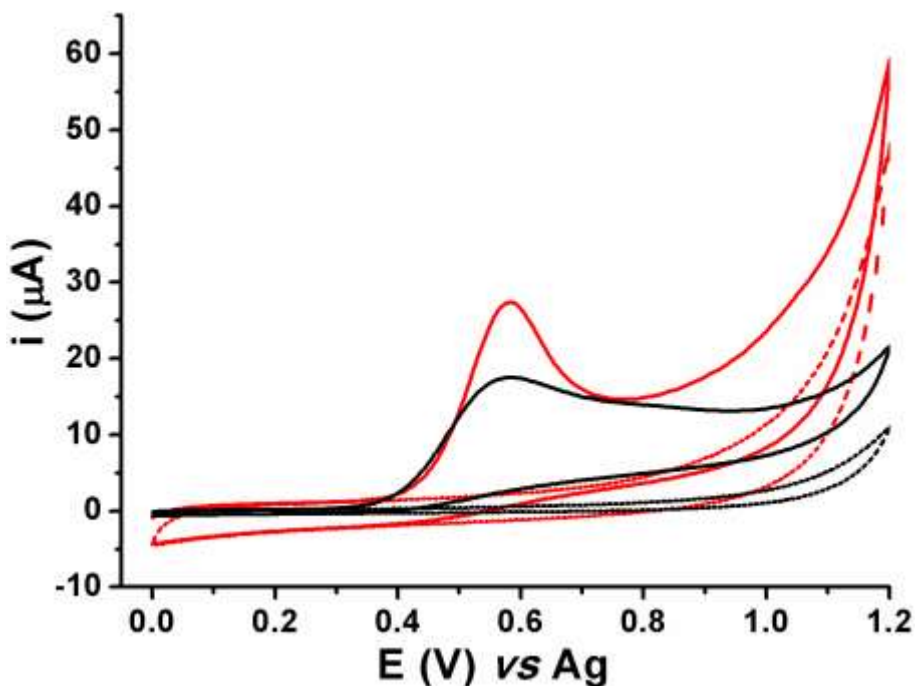
$$E_{pa1}(V) = 0,96 (\pm 0,01) + 0,063 (\pm 0,001) \text{ pH} \quad (5)$$

Como pode ser observado na equação 5 acima, a inclinação da reta obtida foi de $0,063 \text{ V pH}^{-1}$, cujo valor está próximo do valor teórico de $0,059 \text{ V pH}^{-1}$ que caracteriza uma reação eletroquímica que envolve o mesmo número de prótons e elétrons (KISSINGER; HEINEMAN, 1984). Esses resultados corroboram com os estudos reportados usando o BDDE para oxidação da SB (FREITAS et al., 2019).

A fim de escolher o melhor pH para realizar análises mais sensíveis e seletivas da SB no SPE-Gr, o pH 7,0 foi escolhido. Isso porque, como mostrado na Figura 12, o pH 7,0 apresenta um dos menores E_{pa} para detecção da SB e uma das maiores corrente de pico anódica (I_{pa}) para quantificação deste analito. A busca de um menor E_{pa} para determinação da SB está relacionada ao possível aumento da seletividade, evitando a oxidação no SPE-Gr de outras espécies interferentes contidas na amostra. Assim, com pH 7 escolhido para as análises,

avaliou-se a possibilidade de uso de outro eletrólito usando o mesmo pH, como por exemplo, o tampão fosfato (Figura 15).

Figura 15 - VCs registrados no SPE-Gr para soluções de TBR (linhas vermelhas) e tampão fosfato (linhas pretas), ambos a 0,1 M pH 7,0, antes (linhas tracejadas) e depois (linhas sólidas) da adição de SB a 0.2 mM. Todas varreduras de potencial iniciaram a 0,0 V no sentido anódico com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.



Como mostrado na Figura 15 o melhor sinal de corrente de pico para oxidação da SB é dado no TBR pH 7,0 (linha vermelha), logo este meio foi utilizado nas análises posteriores. Essa diferença de comportamento entre os eletrólitos pode estar relacionada ao pela diferença da força iônica nessas soluções, bem como pela melhor difusão da SB na solução de TBR do que em tampão fosfato. Dessa forma, usando o TBR em pH 7,0, o controle do transporte de massa da SB até o SPE-Gr foi avaliado pelo estudo da velocidade de varredura (ν) na VC (Figura 16). Usando os dados de I_{pa} e E_{pa} da SB nesse estudo, os gráficos das relações de I_{pa} vs ν , I_{pa} vs $\nu^{1/2}$ e $\log I_{pa}$ vs $\log \nu$ foram plotados e são apresentados na Figura 17.

Figura 16: VCs em TBR $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 com adição de SB $0,5 \text{ molL}^{-1}$ em diferentes velocidades (10 a 150 mV s^{-1}) usando SPE-Gr.

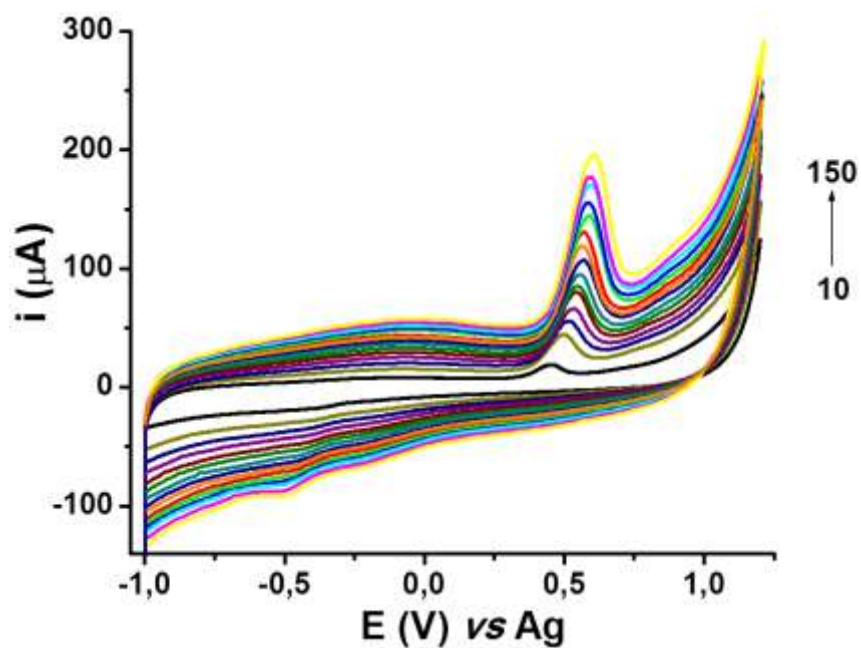
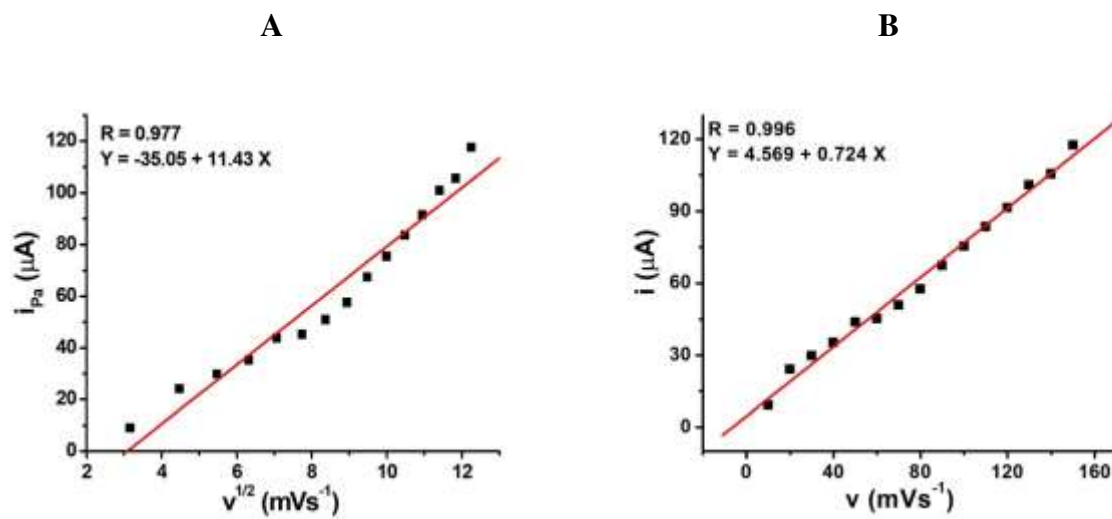
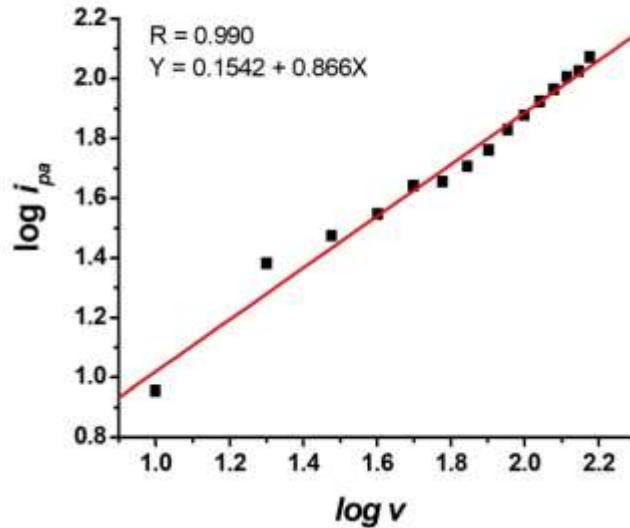


Figura 17- Gráficos plotados dos dados obtidos da Figura 16 para relações de (A) I_{pa} vs $v^{1/2}$, (B) I_{pa} vs v , e (C) $\log I_{pa}$ vs $\log v$.



C



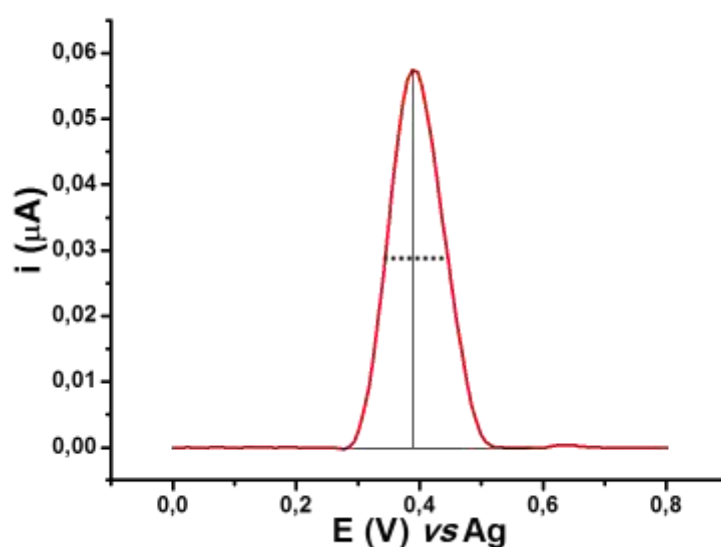
Como esperado, a Figura 17 mostra, pelos voltamogramas, que a I_{pa} do processo de oxidação da SB no SPE-Gr é proporcional ao aumento da velocidade de varredura na VC. Analisando os dados obtidos desse aumento de I_{pa} da SB em função da velocidade nos gráficos plotados nas Figuras 17A-17B é possível notar uma melhor linearidade entre a relação de I_{pa} vs v (Figura 17B) do que para I_{pa} vs $v^{1/2}$ (Figura 17A), as quais apresentaram coeficientes de correlação linear de 0,996 e 0,977, respectivamente. O comportamento mais linear entre a I_{pa} e v para processo de oxidação da SB no SPE-Gr indica que este analito apresenta uma tendência de seu transporte de massa na célula eletroquímica controlado por adsorção (KISSINGER; HEINEMAN, 1984). Além disso, é possível também verificar uma linearidade ($r^2 = 0,990$) na relação de log I_{pa} vs log v (Figura 17C), cuja regressão linear obtida é apresentada na equação 6:

$$\log i = 0,154 + 0,866 (\log v) \quad (6)$$

Dessa forma, o valor obtido de coeficiente angular (0,87) pela equação 6 corrobora com o comportamento apresentado na relação I_{pa} e v , uma vez que valores de inclinação entre 0,5 e 1,0 para relação de log I_{pa} vs log v indicam que o transporte de massa da espécie é dado por adsorção no ET (BARD; FAULKNER, 1980). Assim, pode-se inferir que o processo de oxidação da SB no SPE-Gr é dado por um transporte de massa controlado por adsorção, cujo comportamento também foi reportado em um GCE modificado com grafeno (TERADAL, NARAYAN, JALADAPPAGARI, 2013).

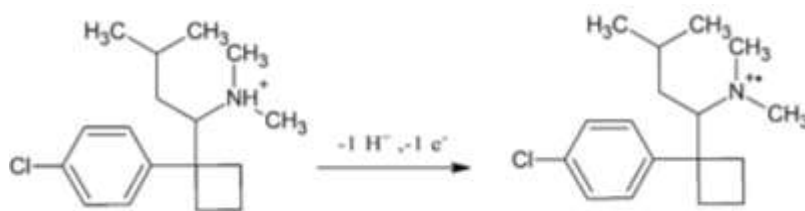
Ainda usando esses estudos de velocidade de varredura, é possível calcular o número de elétrons envolvidos no processo de oxidação da SB no SPE-Gr. Considerando a reação eletroquímica de um composto que possui um transporte de massa por adsorção no ET, o número de elétrons envolvidos pode ser estimado por meio da relação dada por Laviron (BRETT; BRETT, 1996), na qual a largura a meia altura ($W_{1/2}$) da I_p obtida pela DPV é correspondente a $90,6 \text{ mV}/n$, onde n é o número de elétrons. Sendo assim, um DPV da SB no SPE-Gr foi registrado para realizar esse cálculo, como mostrado na Figura 18.

Figura 18 – DPV com correção de linha de base da SB mol⁻¹ em meio à TBR pH 7,0 0,1 molL⁻¹. A linha tracejada indica a $W_{1/2}$ da I_p .



De acordo com DPV obtido na Figura 18, $W_{1/2}$ obtida foi de 103 mV, o que corresponde a $n \approx 1$. Assim, considerando o transporte de massa controlado por adsorção e os resultados obtidos pela relação entre E_{pa} vs pH (Figura 12), o número de elétrons envolvidos no primeiro de processo de oxidação da SB no SPE-Gr é dado por 1 elétron e 1 próton.

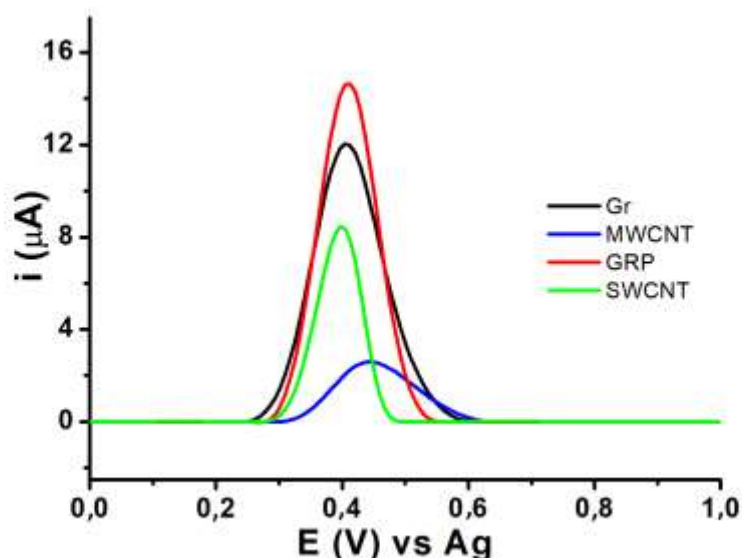
Figura 19 - Mecanismo proposto para eletrooxidação da SB proposto por Freitas e colaboradores (FREITAS et al., 2019)



Freitas e colaboradores propuseram o mecanismo de oxidação da SB, como mostrado na figura 19. Esse mecanismo proposto foi em meio ácido ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$) em BDDE e mostrou como sendo a oxidação do grupo amina terciária protonada, consumindo um elétron e produzindo um radical catiônico. Esse estudo corrobora com o presente trabalho, que evidenciou que a oxidação também ocorre com a perda de 1 elétron e 1 próton.

No sentido de avaliar o melhor ET usado no SPE para determinar a SB, foram comparados três diferentes materiais de carbono, grafeno e dois tipos de nanotubos de carbono (CNT, da sigla em inglês *carbon-nanotube*), o MWCNT (da sigla em inglês *multi-walled carbon nanotubes*) e SWCNT (da sigla em inglês *single-walled carbon nanotube*), sendo os voltamogramas obtidos por DPV exatamente após 1,0 minuto da adição da SB, como mostrado na Figura 20.

Figura 20 - DPVs em TBR $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 com adição de SB $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$ em diferentes eletrodos impressos de carbono. Amplitude de 80 mV e velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} .



Como pode ser visto na Figura 20, os SPE a base de CNTs e grafeno apresentaram as menores e maiores I_{pa} para detecção da SB, respectivamente. Nessa Figura 20 também pode ser observado que o SPE-Gr apresentou uma I_{pa} para SB apenas um pouco inferior ao SPE-Gf. Vale destacar que, os materiais de grafeno e CNT são comumente adicionados por meio de uma modificação da superfície dos SPE-Gr e, assim, podem apresentar uma baixa reprodutibilidade na sua produção. Dessa forma, o uso de SPE-Gf e SPE-CNT podem oferecer uma menor precisão entre os SPEs para aplicação do método proposto, principalmente, no caso do grafeno, cujo material é constantemente desprendido do ET no SPE. Por outro lado, o material de carbono grafite no SPE não é considerado uma modificação na superfície do ET, apresentando uma melhor reprodutibilidade na sua produção. Além disso, o SPE-Gr apresenta um menor custo para aquisição, que pode ser uma considerável vantagem para aplicação em métodos de triagem simples e rápidos, como proposto nesse trabalho para SB em chá dietéticos.

Considerando todos resultados do comportamento eletroquímico da SB, a seguir é mostrado a otimização da técnica de AdSDPV usando o SPE-GR em meio de TBR pH 7,0 para determinação desse estimulante.

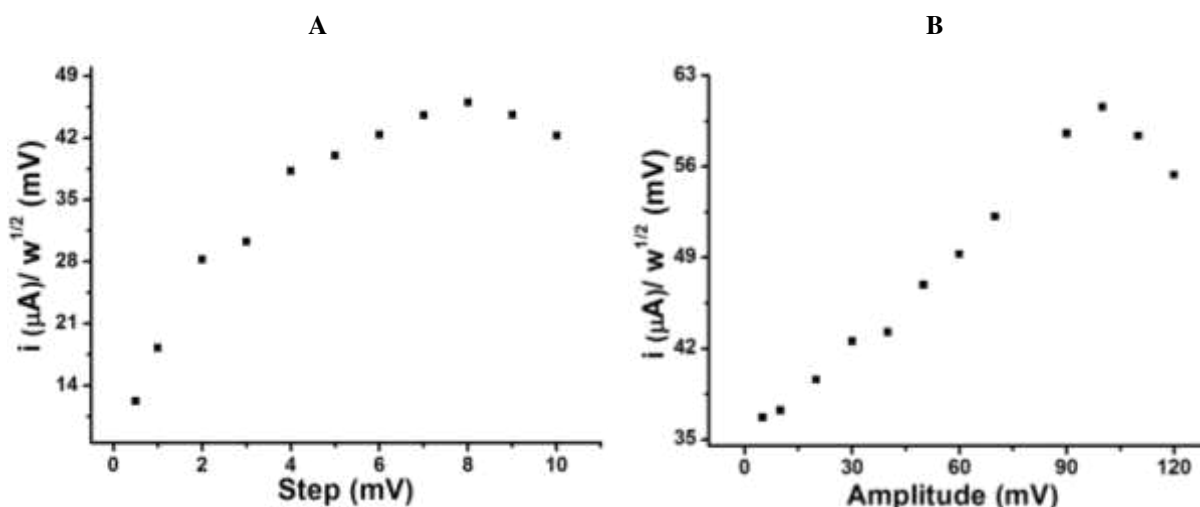
4.1.2 Otimização dos parâmetros da AdSDPV

Após os estudos do comportamento eletroquímico da SB e escolha do meio eletrolítico e ET no SPE a ser utilizado, foram feitas as otimizações da técnica AdSDPV. Embora, a técnica de voltametria de onda quadrada possa proporcionar uma eletroanálise mais rápida do que a detecção por DPV, esta última técnica, em geral, apresenta melhor estabilidade do sinal eletroquímico, permitindo uma análise com maior repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Além disso, quando o comportamento eletroquímico do composto é irreversível no ET, a sensibilidade entre estas duas técnicas voltamétricas de pulso são semelhantes, considerando a mesma velocidade de varredura. Dessa forma, devido à adsorção da SB no SPE-Gr, a DPV foi associada com a técnica voltamétrica de redissolução (AdSDPV) para determinação da SB neste trabalho.

Os parâmetros do modo de detecção por DPV foram inicialmente otimizados com a finalidade de se obter uma maior sensibilidade aliada à resolução do pico, portanto, na escolha do *step* e da amplitude de potencial, usou-se a relação altura do pico dividido pela largura de meia altura ($w_{1/2}$), e o valor mais alto desta relação foi o parâmetro otimizado. Esse

estudo foi realizado de forma univariada, mantendo um dos parâmetros constante e variando o outro a ser investigado, como é mostrado para step e amplitude nas Figura 21A e 21B, respectivamente.

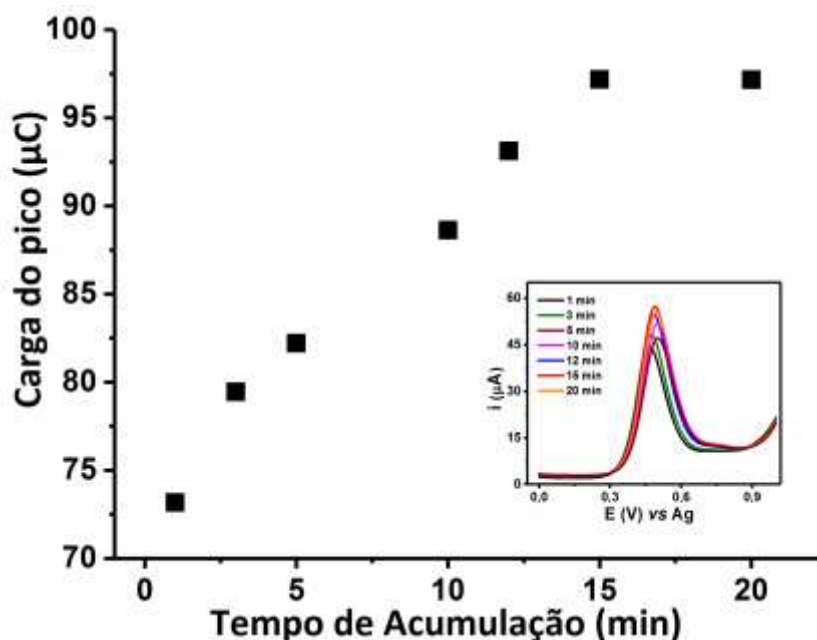
Figura 21- Respostas de correntes dos picos de oxidação divididos pela largura de meia altura em função do Step (A) com amplitude constante de 50 mV e da Amplitude (B) com step constante de 5mV. Ambas as medidas foram obtidas a partir de DPVs de 100 μmolL^{-1} de SB no SPE-Gr em de TBR 0.1 M (pH 7.0).



De acordo com a Figura 21, o step e amplitude atingiram um valor máximo da relação de $I_{pa}/W_{1/2}$ em 8 mV e 100 mV, sendo esses parâmetros otimizados escolhidos para detecção da SB pela técnica DPV. Vale mencionar que, o step otimizado pelo software GPES equivale a uma velocidade de varredura de 80 mVs^{-1} na DPV. Como supracitado, o transporte de massa da SB no SPE-Gr é controlado por adsorção, com isso, há a possibilidade de fazer uma pré-concentração do analito na superfície do eletrodo, o que gera uma maior sensibilidade das análises.

Dessa forma, foi feito um estudo do melhor tempo de acumulação, a fim de obter a maior sensibilidade para SB no SPE-Gr (Figura 22). Esse estudo foi melhor avaliado considerando a carga (Q) em coulombs (C) do processo de oxidação da SB, a qual é calculada pela área total do pico de oxidação dividida pela velocidade de varredura da análise, sendo este valor de Q obtido em μC . Cabe mencionar que, o uso da I_{pa} em função do tempo de acumulação não foi utilizado nesse estudo devido à variação nos resultados pela alteração na área do pico de oxidação da SB no SPE-Gr.

Figura 22 - Respostas da carga do pico de oxidação em função do tempo de acumulação em 100 mmolL^{-1} de SB no SPE-Gr em $0,1 \text{ M TBR}$ ($\text{pH } 7,0$). Na inserção estão os AdSDPVs registrados em cada tempo no SPE-Gr a 80 mV s^{-1} e amplitude de 100 mV .



Na Figura 22 é possível observar que a carga da área do pico de oxidação da SB aumentou em função do tempo de acumulação, sendo em 15 minutos atingindo a taxa máxima de adsorção no SPE-Gr. Dessa forma, o tempo de acumulação de 15 minutos foi escolhido para uma detecção mais sensível da SB em chás dietéticos usando o método proposto. Embora esse tempo de 15 min seja muito longo para uma eletroanálise, comparado aos métodos baseados em cromatografia, o método proposto ainda se apresenta rápido para determinação de SB em amostras de chás. Além disso, devido ao considerável aumento na carga do pico de oxidação usando 15 min, esse tempo é justificado para uma detecção de alta sensibilidade da SB usando o SPE-Gr e a AdSDPV.

Sendo assim, a partir de todos estudos de otimização realizados, os parâmetros da técnica eletroquímica usada no método proposto são sumarizados na tabela 3. Nessas condições apresentadas na Tabela 3, os estudos dos parâmetros analíticos do método proposto foram investigados a seguir para determinação da SB.

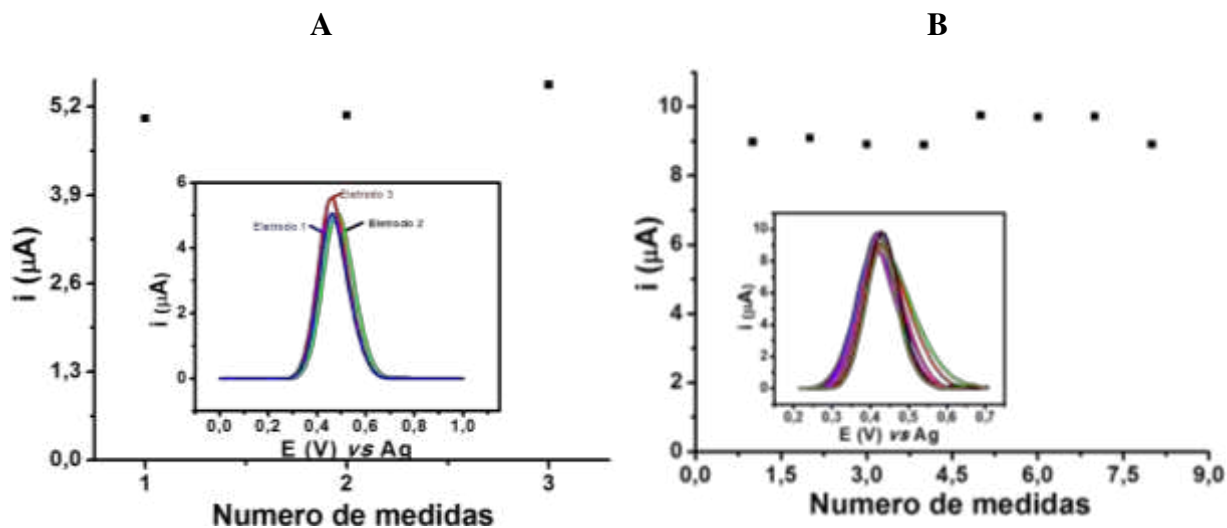
Tabela 3- Parâmetros eletroquímicos otimizados para a determinação de SB.

Parâmetro	Valor
Eletrólito	TBR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0
ET	SPE-Gr
Incemento de potencial	8 mV
Velocidade de varredura	80 mVs ⁻¹
Amplitude	100 mV
Tempo de acumulação	15 minutos

4.1.3 Estudos dos parâmetros analíticos para determinação da SB pelo método proposto

Os estudos de estabilidade da detecção eletroquímica da SB usando o método proposto foi realizado com um prévio condicionamento do SPE-Gr no eletrólito suporte aplicando 10 ciclos pela VC na faixa de potencial de -1,0 a 1,2 V a 100 mV s⁻¹. Esse procedimento foi necessário para melhorar a estabilidade do sinal no SPE-Gr devido à forte adsorção dos produtos de oxidação da SB no ET deste SPE. Após esse condicionamento, a avaliação a estabilidade do sinal eletroquímico na detecção da SB por AdSDPV foi realizada por meio de estudos de repetibilidade (Figura 23A) usando o mesmo SPE-Gr (n=8) e de reprodutibilidade (Figura 23B) usando diferentes SPEs-Gr (n=3).

Figura 23 - I_{pa} obtidas em função do número de medidas para oito análises consecutivas de uma solução de SB $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando um mesmo SPE-Gr (A) e três análises em diferentes SPEs-Gr numa solução de SB $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B). Nas inserções são mostrados os AdSDPVs das respectivas análises realizados em TBR 0.1 mol L^{-1} (pH 7.0) com velocidade de varredura a 80 mV s^{-1} , amplitude 100 mV e tempo de acumulação de 15 minutos.



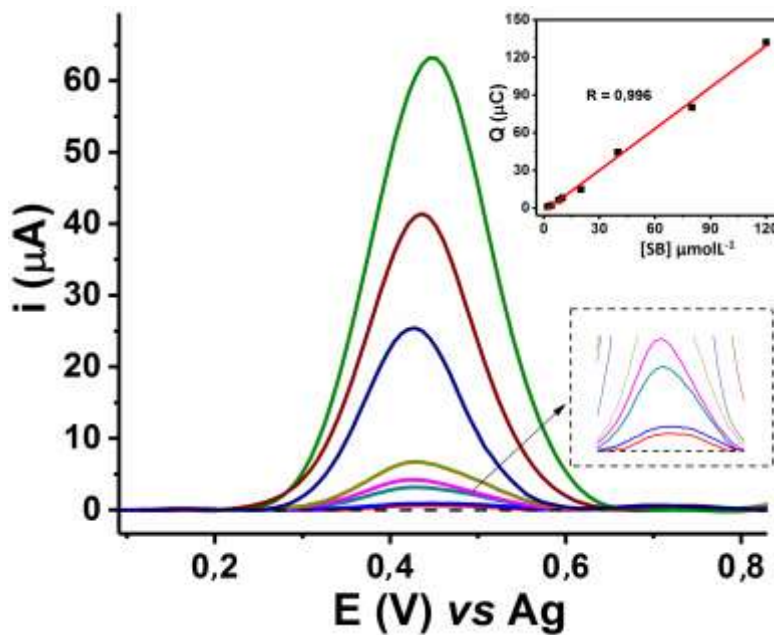
Como pode ser observado na Figura 23A, há uma pequena variação nas I_{pa} da SB usando o mesmo SPE-Gr, sendo obtido um DPR de 3,7% para oito análises consecutivas. Além disso, observa-se na Figura 23A que o E_{pa} da SB no SPE-Gr praticamente não é alterado entre as análises realizadas, possibilitando por meio desse potencial uma identificação preliminar (triagem) precisa desse composto em diversas amostras. Todavia, após essas oito análises da SB no SPE-Gr foi observado uma diminuição mais significativa na I_{pa} (não mostrado nessa Figura 23A), evidenciando uma tendência de contaminação ou passivação do ET neste sensor em função das medidas realizadas.

No que tange ao estudo de reprodutibilidade, é possível notar novamente na Figura 23B que E_{pa} da SB não é alterado mesmo usando três diferentes SPEs-Gr, corroborando com grande potencial para aplicação do método proposto na triagem desse estimulante em amostras complexas. Embora, tenha sido verificado uma maior diferença entre I_{pa} usando diferentes SPEs-Gr, o DPR obtido de 6,0%, pode ser considerado aceitável por se tratar de eletrodos descartáveis.

Na sequência foi estudada a faixa linear de trabalho usando o método proposto para a determinação de SB de 2,0 a 120 mM em meio de TBR 0,1 M pH 7,0 (Figura 24). Do mesmo modo como foi feito na otimização do tempo de acumulação na AdSDPV, nesse

estudo foi considerado a carga (Q) em coulombs (C) do processo de oxidação da SB no SPE-Gr, uma vez que melhores resultados foram obtidos para faixa de concentração investigada na curva analítica.

Figura 24 - AdDPVs da SB em concentrações de 2,0 a 120 μmolL^{-1} em TBR 0.1 molL^{-1} (pH 7.0) no SPE-Gr. Na inserção é mostrada a regressão linear e uma ampliação dos menores sinais, correspondentes às concentrações de 2,0 a 10 μM . Tempo de acumulação de 15 min. Amplitudes de 100 mV e velocidade de varredura de 80 mV s^{-1} .



A Figura 24 mostra que I_{pa} do processo de oxidação da SB no SPE-Gr é proporcional a concentração deste composto na célula eletroquímica, demonstrando também uma proporcionalidade da concentração do analito com a área de pico do seu processo de oxidação. Sendo assim, a regressão linear da curva analítica foi gerada pela médias das cargas obtidas em cada voltamograma da AdSDPVs realizado em triplicata para as respectivas soluções padrão de SB (2,0 μmolL^{-1} até 120,0 μmolL^{-1}). Na inserção da Figura 24 é mostrada a regressão linear obtida nessa faixa concentração com um coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,996, cuja a equação 7 apresentada:

$$Q (\mu\text{C}) = -3,0 (\pm 1,5) + 1,10 (\pm 0,03) (\mu\text{C}/\mu\text{molL}^{-1}) [\text{SB}] \quad (7)$$

Cabe mencionar que, usando a tradicional I_{pa} para obter a curva analítica para determinação da SB, a mesma faixa linear foi obtida, porém apresentando um menor número de pontos colineares e uma regressão com sensibilidade 1,6 vezes inferior ao demonstrado na

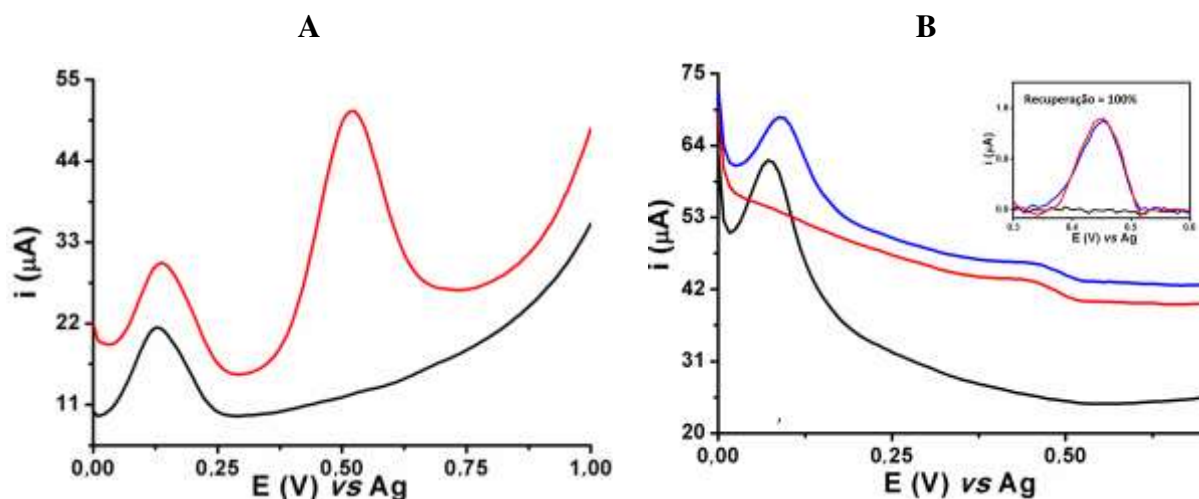
equação 7 usando a carga do pico de oxidação, que foi de $1,10 \mu\text{C}/\mu\text{molL}^{-1}$ para determinação da SB. Dessa forma, baseado na curva analítica da Figura 24 e na equação 7, um baixo LOD de $0,3 \mu\text{molL}^{-1}$ foi obtido para detecção da SB.

Além disso, vale mencionar que, o menor sinal mensurável de apenas $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$ pode ser visto nitidamente (linha vermelha) na ampliação mostrada na Figura 24 para a determinação da SB pelo método proposto. De acordo com a literatura (FDA), para análises forenses a metodologia deve ser capaz de detectar 0,5% (m/m), ou mais, da SB em amostras adulteradas. Isso corresponde a níveis de cerca de $75 \mu\text{molL}^{-1}$ extraídos de um sachê de chá contendo 1,0 g, sendo essa bebida feita com 200 mL de água. Deste modo, a faixa linear de obtida pelo método proposto para determinar a SB é adequada para analisar esse composto em amostras de chás dietéticos, sendo possível detectar e quantificar esse analito em concentrações menores que 0,1 % (m/m) nessas amostras, considerando uma diluição de 10 vezes no eletrólito suporte. Por outro lado, a SB já foi encontrado como adulterante no chá de emagrecimento em níveis inferiores a 0,5%, como reportado em 1,8 mg por porção de chá (200 mL) (KOEHLER et al., 2007). Esse valor é correspondente a níveis em torno de $30 \mu\text{molL}^{-1}$ de SB na amostra. Portanto, mesmo diluindo a amostra de chá 10 vezes, a concentração de SB estaria a $3,0 \mu\text{molL}^{-1}$ na célula eletroquímica para análise, permitindo que o método proposto seja capaz de identificar e quantificar a SB em amostras de chás adulterados com esse estimulante.

4.1.4 Validação e aplicação do método proposto em amostras de chá

A validação da metodologia proposta para aplicação em amostras de chás foi feita através do estudo de adição e recuperação. A amostra de chá foi diluída dez vezes no eletrólito suporte e os registros dos voltamogramas obtidos pela AdsSDPV com SPE-Gr podem ser visto sem e com adição de $50 \mu\text{molL}^{-1}$ de SB nessa amostra Figura 25A. A Figura 25B mostra o estudo de adição e recuperação realizado nessa mesma amostra com concentrações mais baixas de SB ($2,5 \mu\text{molL}^{-1}$).

Figura 25 - AdSDPVs no SPE-Gr de uma amostra de chá diluído (10 vezes) em TBR $0,1\text{molL}^{-1}$ (pH 7,0) (linha preta) em (A) sem e com adição de $50,0\ \mu\text{molL}^{-1}$ de SB (linha vermelha) e em (B) sem e com adição de $2,5\ \mu\text{M}$ de SB (linha azul), bem como somente da solução padrão de SB a $2,5\ \mu\text{M}$ em TBR (linha vermelha). Na inserção estão os voltamogramas com correção de linha de base. As condições de ambos os estudos: Amplitude de $100\ \text{mV}$ e velocidade de varredura $80\ \text{mV s}^{-1}$, tempo de acumulação de $15\ \text{min}$.



Como pode ser verificado no voltamograma da amostra (linha preta) apresentado na Figura 25A, um processo de oxidação é notado no SPE-Gr com E_{pa} em torno de $+0,1\ \text{V}$, o qual tem origem desconhecida, mas provavelmente pode ser devido a presença de alguns compostos antioxidantes no chá analisado. No entanto, esse processo observado não interfere na oxidação de SB no SPE-Gr, que ocorre próximo à $+0,5\ \text{V}$. Na Figura 25B também é notado o processo de oxidação em $+0,1\ \text{V}$ no SPE-Gr no voltamograma do chá diluído 10 vezes (linha preta). Além disso, na Figura 25B foi feita a adição de apenas $2,5\ \mu\text{molL}^{-1}$ de SB ao chá (linha azul), sendo esse sinal detectável e comparado ao obtido apenas com a solução padrão deste analito (linha vermelha). O estudo de adição e recuperação do sinal de SB foi avaliado após tratamento desses dados para correção da linha de base, conforme mostrado na inserção da Figura 25B e descrito na parte experimental, sendo obtido uma ótima recuperação de $99,4 \pm 4,5\%$ ($n = 3$). Essa recuperação próxima a 100% mostra que a metodologia utilizada é eficiente na determinação de SB em amostras de chás, não apresentando efeito de matriz, ou seja, os demais componentes do chá presentes não interferem na determinação e quantificação da SB.

A metodologia proposta para a determinação de SB, utilizando a AdSDPVs com um SPE-Gr se mostrou eficiente para a aplicação em amostras de chás dietéticos. Dessa

forma, é possível verificar possíveis adulterações nesses suplementos, visto que o limite de quantificação atingido é suficiente para detectar a concentração encontrada em adulterações descritas na literatura por Martini e colaboradores por que é de 30 mmolL⁻¹ (MARTINI et al., 2015).

4.1.5 Comparação do método proposto com outros métodos eletroanalíticos reportados para determinação da SB

Tabela 4: Comparação de alguns métodos para determinação eletroanalítica de SB

Técnica	ET	Faixa Linear (µmolL ⁻¹)	LOD (µmolL ⁻¹)	Sinal mensurável (µmolL ⁻¹)	Amostra	Referência
AdSDPV	ERGO-GCE	0,25–20,0	0,05	0,25	Urina e soro	TERADAL; NARAYAN; JALADAPPAGARI, 2013.
POT	Membrana seletiva	4,0–10000	9,0	4,0	Formulações farmacêuticas	El GOHARY; El NASHAR; ABOUL-ENIEN, 2011.
POT	Membrana seletiva	10,0–10000	8,0	10,0	Formulações farmacêuticas	ZAYED; ISSA,2010.
SWV e Bia-SWV	BDDE	15,0–150	0,20 -5,8	15,0	Chás e suplementos vitamínicos	FREITAS et al., 2019
POL	HDME	4,2–100	1,2	4,2	Chás e formulações farmacêuticas	CARVALHO et al., 2012.
AdSDPV	SPE-Gr	2,0–120	0,3	2,0	Chás	Este trabalho

Para fins de comparação do desempenho do método proposto, a Tabela 4 apresenta os principais parâmetros analíticos obtidos para a determinação de SB por outros métodos eletroanalíticos encontrados na literatura em diferentes amostras. Até o presente momento, apenas três trabalhos foram relatados para detecção de sibutramina em bebidas de chá. Além disso, como pode ser visto na Tabela 4, o método proposto neste artigo apresenta o menor sinal mensurável para amostras de chá, que é um LOD mais valioso do que um LOD

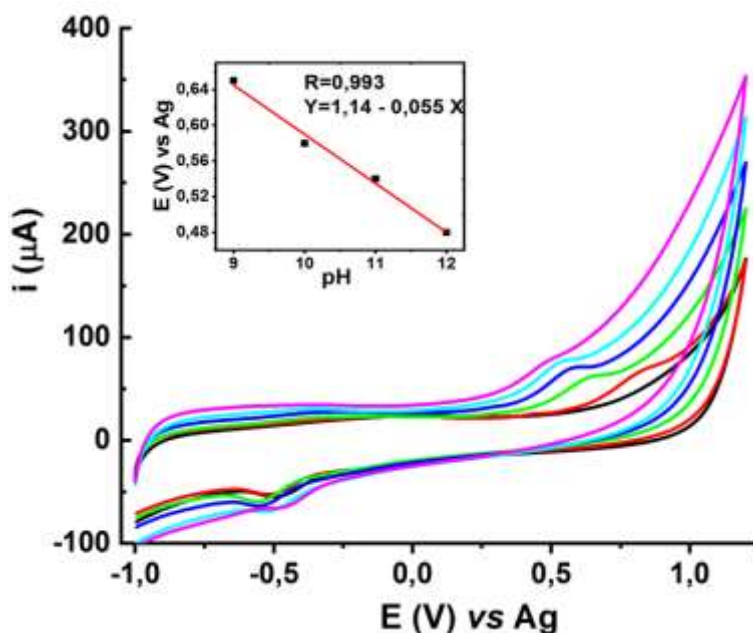
estimado, pois revela uma medida mais realista do limite no qual o método pode ser aplicado de forma útil. Além disso, um dispositivo descartável baseado em um sensor eletroquímico não modificado, como o SPE-Gr, oferece uma aplicação mais simples e atraente em análises forenses de rotina para determinação de sibutramina.

4.2 Determinação da EF em amostras em chás dietéticos

4.2.1 Comportamento eletroquímico da EF

Com a VC, foi estudado o comportamento eletroquímico da EF em diferentes pHs, com o TBR de pH 2 a 12. As leituras foram realizadas em toda a janela de potencial permitida pelo SPE-Gr (-1,0 a 1,2 V). Foi possível observar que a EF apresenta um processo de oxidação irreversível apenas em pHs superiores à 7,0, como mostrado na Figura 26.

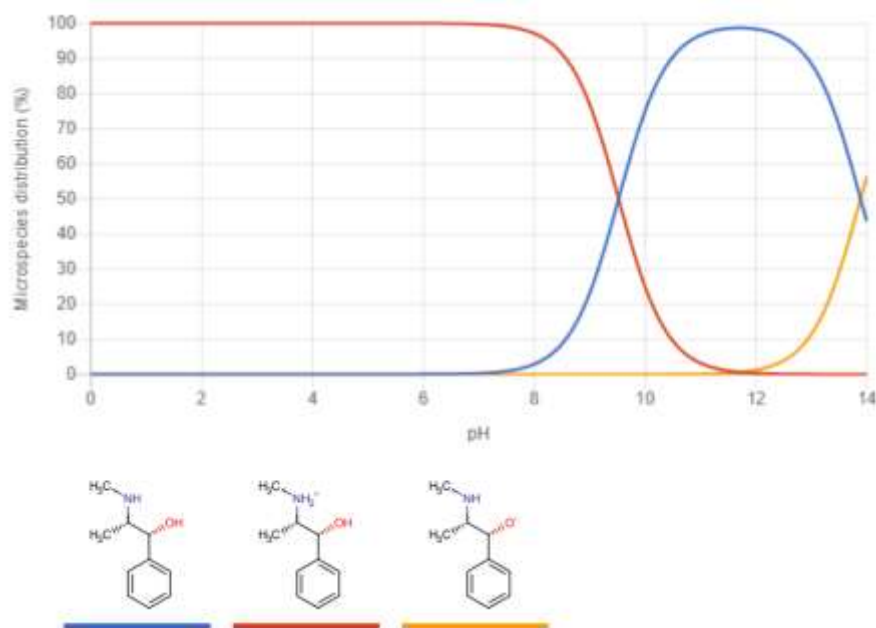
Figura 26 - VCs em diferentes pHs (7,0 a 12,0) em tampão B-R 0,1 M com adição de 1,0 mmolL⁻¹ de EF. As varreduras potenciais foram iniciadas em 1,0 V na direção positiva, com uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.



Como mostrado na Figura 26, no voltamograma em pH 7,0 (linha preta) não há nenhum processo de oxidação da EF no SPE-Gr, sendo esse inicialmente observado em pH 8,0 (linha vermelha), o qual se deslocou para potenciais menos positivos até pH 12,0 (linha rosa).

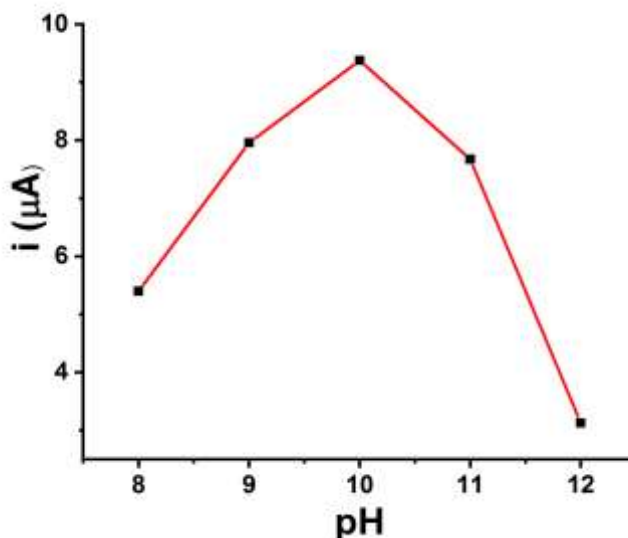
Além disso, é possível observar na Figura 26 um processo catódico próximo ao potencial de -0,5V (vs AG), cujo pico de corrente é atribuído à redução de oxigênio, uma vez que essa solução não foi desairada antes das análises. A dificuldade de remoção do oxigênio na solução foi novamente devido à adição do pequeno volume de solução via drop-casting no SPE-Gr. Vale destacar ainda que esses picos de corrente também foram observados nos voltamogramas do eletrólito suporte, sem adição da EF.

O deslocamento do processo de oxidação da EF no SPE-Gr (Figura 26) apresentou uma relação linear do E_{pa} entre pHs 9,0 a 12,0, conforme mostrado na inserção da Figura 26, cuja equação da reta mostra uma inclinação de $0,055 \text{ V pH}^{-1}$. Esse valor sugere que a razão entre prótons e elétrons na oxidação do EF é igual a um. O processo de oxidação da EF foi estudado por Chicharro e colaboradores, com um eletrodo de carbono vítreo, em meio a TBR pH 10, os quais encontraram também um processo de oxidação irreversível em 0,92 V vs Ag/AgCl. Esse processo de oxidação, segundo os autores, ocorre com uma perda de dois elétrons e dois prótons (CHICHARRO et al., 1993), o que corrobora com estudos de pH obtidos no presente trabalho. Freitas e colaboradores descrevem bem esse processo de oxidação, o atribuindo a uma transferência de dois elétrons da amina secundária presente na molécula de EF, resultando em um intermediário íon imínio que sofre hidratação e rearranjo intramolecular para obter produtos de N-desalquilação correspondentes a uma amina primária protonada e formaldeído (FREITAS et al., 2021). Todavia, no sentido avaliar o motivo pelo qual a EF não apresenta processos de oxidação em meio ácidos, o gráfico de distribuição de espécies da EF em função do pH foi analisado, conforme mostra a Figura 27 (CHEMICALIZE, 2022).

Figura 27 - Distribuição da molécula de EF em diferentes pHs.

Na Figura 27 é possível notar que o grupo amina da molécula de EF apresenta-se de forma protonada até o pH 8,0. Dessa forma, possivelmente, a oxidação do grupo amina da EF não ocorre quando este grupo está na forma protonada, justificando a ausência de processos anódicos em meio ácido no SPE-Gr. Além disso, é possível justificar a faixa de linearidade observada entre E_{pa} e pH (inserção da Figura 26), sendo essa relação obtida somente após o pK_a (9,65) da EF, uma vez que um maior número de moléculas desprotonadas no grupo amina da EF encontra-se presente na solução. Esse comportamento pode justificar parcialmente a I_{pa} da EF nessa faixa de pH estudado (Figura 26), conforme é mostrado na Figura 28.

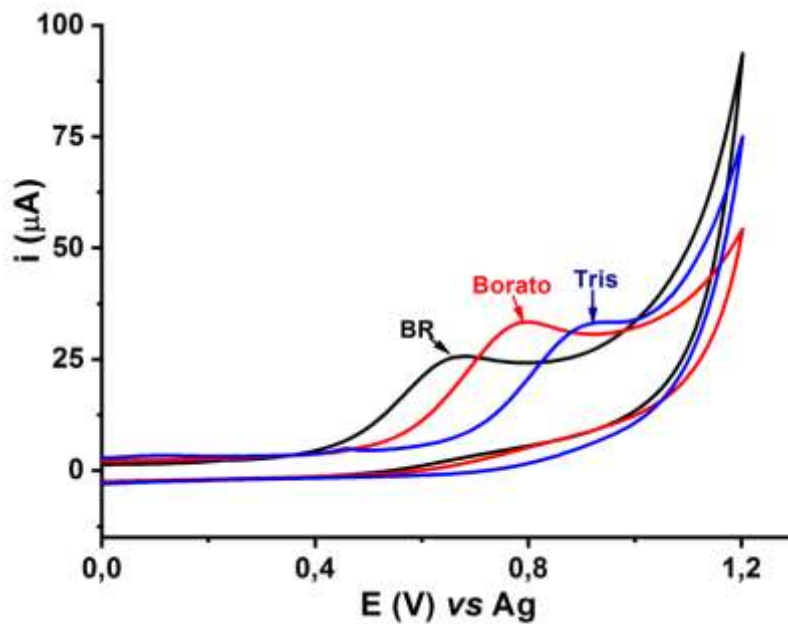
Figura 28 - Relação entre I_{pa} obtidas na Figura 26 em função do pH para processo de oxidação da EF no SPE-Gr.



Na Figura 28 pode de fato ser verificado um aumento significativo da I_{pa} da EF no SPE-Gr de pH 8 a 10. Esse aumento de I_{pa} do fármaco provavelmente está ligado ao aumento do número de moléculas de EF desprotonadas no seu grupo amina (Figura 27). No entanto, não houve um aumento da I_{pa} até pH 11, onde esse grupo da molécula de EF encontra-se 100 % desprotonada (Figura 27). Assim, outros fatores podem estar afetando a I_{pa} da EF em meio mais básicos, sendo um desses possivelmente ligado a solubilidade da molécula de EF, que se torna praticamente insolúvel em água pH maiores que 10,0.

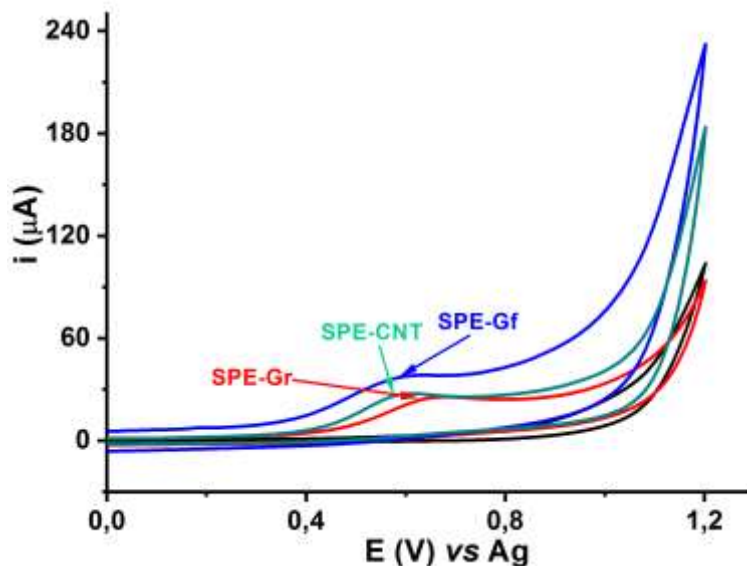
Dessa forma, o pH 10 foi escolhido para realizar a determinação da EF devido à sua maior sensibilidade (Figura 28) e boa definição do pico de corrente (linha azul na Figura 26) no SPE-Gr. A fim de avaliar a resposta eletroquímica da EF no SPE em outros eletrólitos suporte usando o mesmo pH 10,0, além do TBR, outros tampões foram avaliados e comparados como o borato e Tris, conforme mostra a Figura 29.

Figura 29 - VCs em TBR $0,1 \text{ molL}^{-1}$, tampão de borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ e tampão Tris, todos em pH 10,0, com adição de 1 mmolL^{-1} de EF usando SPE-Gr. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Como apresentado na Figura 29, houve um deslocamento do E_{pa} usando diferentes eletrólitos suportes no mesmo pH 10,0, que poderia ser justificado pela variação do potencial no pseudo referencia (Ag) usado no SPE-Gr, não podendo esse parâmetro ser avaliado para escolher a melhor solução tampão neste pH. Por outro lado, uma maior I_{pa} foi obtida com o uso do tampão borato em pH 10, assim, este eletrólito suporte foi o escolhido para as análises posteriores na determinação de EF. Neste meio, foram avaliados também alguns tipos de SPE de carbono para determinação da EF, como mostrado na Figura 30 usando o SPE-Gr, SPE-CNT e SPE-Gf.

Figura 30 - VCs em tampão borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 10,0 com adição de EF $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em diferentes SPEs de carbono. Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Na Figura 30 é possível notar que não houve uma diferença significativa para I_{pa} da EF nos três tipos de SPE de carbono que foram avaliados. Apesar do SPE-Gf e SPE-CNT terem mostrado um menor E_{pa} para detecção da EF do que SPE-Gr, essa diferença também pode ter sido gerada devido às variações no potencial do pseudo referência desses SPEs. Sendo assim, optou-se pelo uso do SPE-Gr devidos ao seu menor custo e maior estabilidade se comparado aos outros dois eletrodos, uma vez que os outros materiais de carbono modificados nesses SPEs são constantemente desprendidos, principalmente, no caso do grafeno no SPE-Gf.

Os estudos de velocidades de varredura foram realizados para identificar a forma que se dá o processo de transferência de massa (adsorptivo ou difusional) para a superfície do SPE-Gr. Os voltamogramas realizados estão na Figura 31. As relações entre as I_{pa} vs $v^{1/2}$, I_{pa} vs v e $\log I_{pa}$ vs $\log v$ são mostradas na Figura 32.

Figura 31 - VCs em tampão Borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ pH 10,0 com adição de EF $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ em diferentes velocidades (40 a 300 mV s^{-1}) usando SPE-Gr.

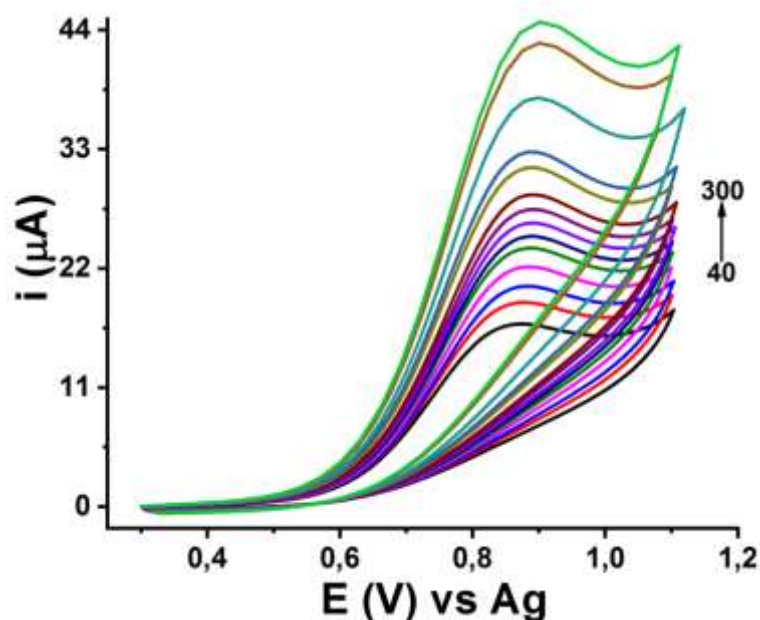
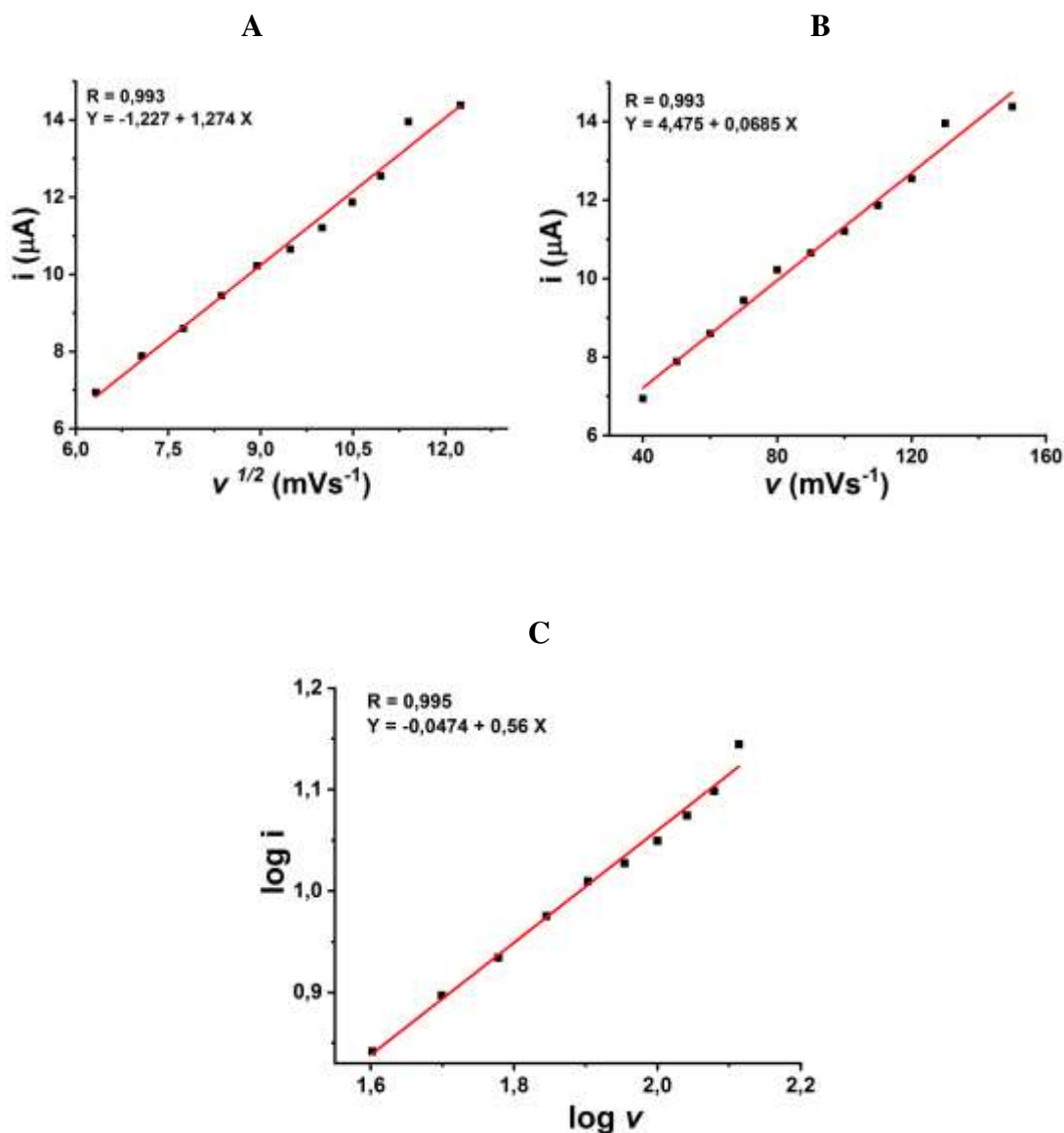


Figura 32 - Gráficos plotados dos dados obtidos da Figura 29 para relações de (A) I_{pa} vs $v^{1/2}$, (B) I_{pa} vs v , e (C) $\log I_{pa}$ vs $\log v$.



Na Figura 31, é nitidamente observada linearidade da I_{pa} do processo de oxidação da EF no SPE-Gr em função da velocidade de varredura. Analisando esses dados obtidos é possível notar uma mesma linearidade entre a relação de I_{pa} vs $v^{1/2}$ (Figura 32A) e I_{pa} vs v (Figura 32B), com ambos os gráficos apresentando coeficientes de correlação linear de 0,993. Tal fato indica que este analito apresenta seu transporte de massa na célula eletroquímica de controle misto, ou seja, controlado tanto por difusão, quanto por adsorção (KISSINGER; HEINEMAN, 1984). Além disso, é possível também verificar uma linearidade ($R = 0,996$) na relação de $\log I_{pa}$ vs $\log v$ (Figura 32C), cuja regressão linear obtida é apresentada na equação 8:

$$\log i = -0,05(\pm 0,04) + 0,56 (\pm 0,02) (\log v) \quad (8)$$

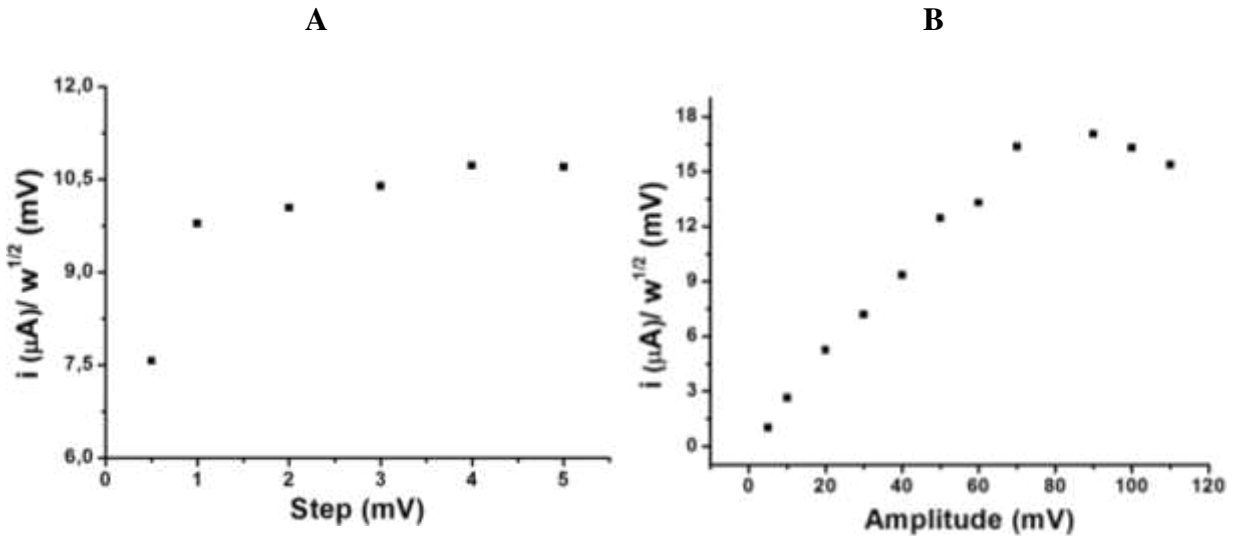
Apesar do valor do coeficiente angular obtido ($\sim 0,6$) estar próximo do valor teórico de 0,5 indicado para controle de transporte de massa difusional da espécie, valores de inclinação entre 0,5 e 1,0 para relação de $\log I_{pa}$ vs $\log v$ indicam que o transporte de massa da espécie é dado tanto por adsorção quanto difusão no ET (BARD; FAULKNER, 1980). Dessa forma, como a relação de I_{pa} versus velocidade de varredura (Figura 32A-B) também não foi conclusiva para, é sugerido que o processo de oxidação da EF no SPE-Gr é dado por um transporte de massa misto, controlado por difusão e adsorção. Nesse sentido, estudos para avaliar o tempo de acumulação da EF no SPE-Gr foram também realizados e são apresentados a seguir usando a técnica de AdSV.

Cabe ainda ressaltar que, devido ao comportamento misto do transporte de massa da EF no SPE-Gr, o cálculo do número de elétrons não foi estimado neste trabalho, sendo o número de elétrons considerado como 2 (dois), conforme foi reportado recentemente por Freitas e colaboradores (FREITAS et al., 2021). Esses autores utilizaram a equação de Laviron para o cálculo de αn e com o gráfico de Tafel (E vs Log i) foi feito o cálculo de α , obtendo assim o número de elétrons. Além disso, como o comportamento eletroquímico da EF usando o SPE-Gr foi semelhante ao observado no BDDE, sugere-se que o mecanismo de oxidação da EF seja o mesmo proposto por esses autores, que indica a oxidação do grupo amina da EF com perda de 2 elétrons e 2 prótons (FREITAS et al., 2021).

4.2.2 Otimização dos parâmetros da AdSDPV

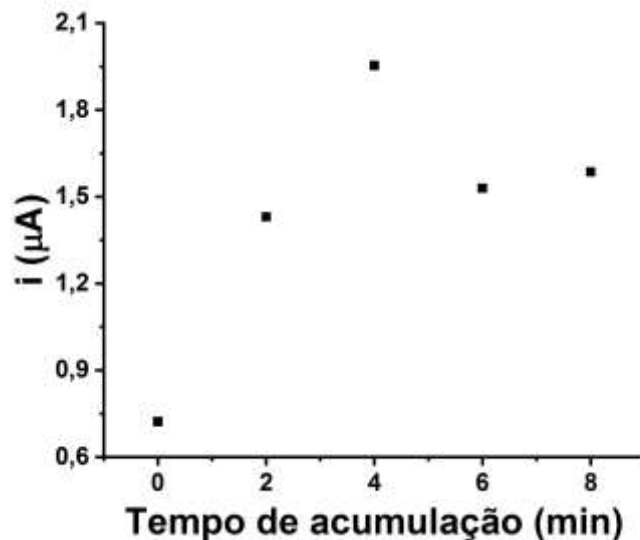
A técnica AdSDPV foi escolhida para as análises de EF nas amostras devido às suas vantagens já citadas anteriormente, como a elevada sensibilidade e estabilidade do sinal eletroquímico. Sendo assim, os parâmetros da técnica foram otimizados pela razão da I_{pa} obtida e sua $W_{1/2}$ a fim de obter uma elevada sensibilidade com uma boa definição do pico de oxidação. A otimização dos parâmetros da técnica foi realizada de forma univariada, sendo estudados o incremento de potencial (step) e a amplitude de pulsos da DPV. Neste estudo, primeiramente, fixou-se a amplitude em 50 mV e o step foi variado de 0,5 a 10,0 mV (Figura 33A). A amplitude foi então avaliada em uma faixa de 5 a 110 mV ((Figura 33B) mantendo o step fixo previamente otimizado em 4 mV.

Figura 33 - (A) Correntes do pico de oxidação divididas pela largura de meia altura em função do step, (B) correntes do pico de oxidação divididas pela largura de meia altura em função da amplitude, ambos com $100 \mu\text{molL}^{-1}$ de EF no SPE-Gr em de tampão borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (pH 10,0).



As Figuras 33A e 33B mostram que a melhor relação de I_{pa} e $w^{1/2}$ foi obtida em step de 4,0 mV e amplitude de 70 mV, respectivamente. Assim, as análises posteriores para determinação da EF por AdSDPV foram realizadas no step de 4,0, o que corresponde à velocidade de 40 mVs^{-1} , e amplitude de 70 mV. Como a EF apresentou processo de transporte de massa misto, controlado por difusão e adsorção no SPE-GR, o próximo parâmetro otimizado na AdSDPV foi o tempo de acumulação, que foi variado de 0 a 8 min (Figura 34).

Figura 34 - Respostas das I_{pa} obtidas do processo de oxidação em função do tempo de acumulação em $100 \mu\text{molL}^{-1}$ de SB no SPE-Gr em $0,1 \text{ M TBR}$ (pH 7,0).



Conforme pode ser observado na Figura 34, de fato a EF tem um comportamento de adsorção no SPE-Gr, porém essa adsorção não foi significativa, atingindo uma taxa de acumulação máxima em 4 min quando uma solução de $100 \mu\text{molL}^{-1}$ deste analito foi utilizada. A Figura 34 também mostra que após 4 min de acumulação da EF no SPE-Gr, aparentemente, a adsorção deste analito diminuiu no ET. Esse comportamento pode ser justificado pelo fato do produto da oxidação da EF estar contaminando (ou passivando) a superfície do ET no SPE-Gr. Sendo assim, o tempo de 4 min foi escolhido para determinação da EF pela AdSDPV. Vale ainda ressaltar que, concentrações mais baixas de EF nesse estudo de acumulação poderiam indicar tempos de acumulação maiores que 4 min. Entretanto, o tempo de 4 min foi mantido no sentido de obter uma identificação mais rápida e prática da EF. Portanto, todos os parâmetros analíticos para a determinação de EF foram otimizados, cujas condições e valores estão apresentados na Tabela 5.

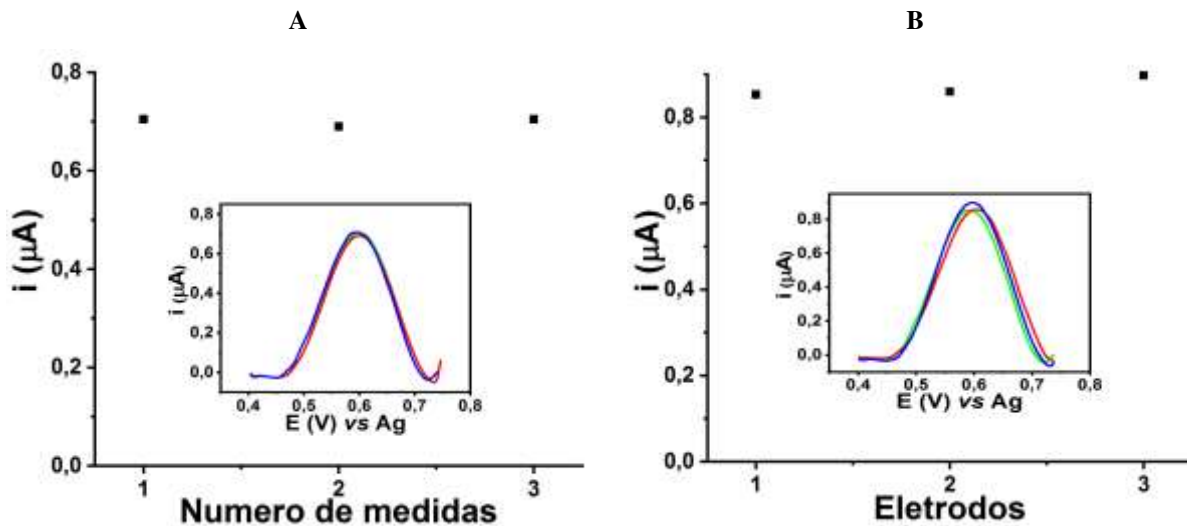
Tabela 5: Parâmetros analíticos otimizados para a determinação de Efedrina:

Parâmetro	Valor
Eletrólito	Tampão borato pH 10,0
Eletrodo	SPE-Gr
Velocidade	40 mVs^{-1}
Amplitude	70 mV
Tempo de acumulação	4 minutos

4.2.3 Estudos dos parâmetros analíticos para determinação da EF pelo método proposto

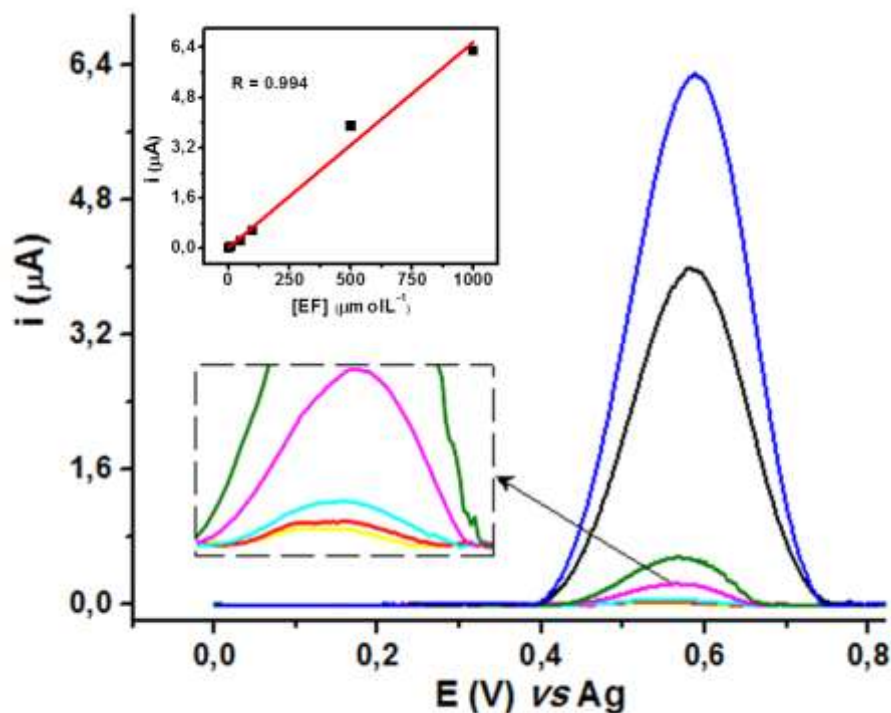
No sentido de avaliar a estabilidade da resposta eletroquímica da EF com detecção AdSDPV, análises consecutivas de uma solução de EF $100 \mu\text{molL}^{-1}$ foram realizadas usando o mesmo (N=3) e diferentes (N=3) SPE-Gr, como mostrado nas Figura 35A e 35B, respectivamente.

Figura 35 – (A) Correntes do pico de oxidação da EF $100 \mu\text{molL}^{-1}$ em função do número de medidas com o mesmo eletrodo. Na inserção são mostrados os VPDs dessas medidas. (B) Correntes do pico de oxidação da EF $100 \mu\text{molL}^{-1}$ em função do número de medidas com diferentes eletrodos. Na inserção são mostrados os VPDs dessas medidas.



Como observado na Figura 35A, os sinais obtidos no SPE-Gr para detecção da EF apresentaram um DPR de 1,3% (N=3). Isso infere que não há contaminação ou passivação da superfície do eletrodo de trabalho causada pelo produto da oxidação da EF no SPE-Gr. O SPE-Gr, mesmo se tratando de um eletrodo descartável, pode ser utilizado mais de uma vez, no entanto, mesmo assim, foi avaliada a reprodutibilidade entre eletrodos. A Figura 35B apresenta a comparação de sinais de 3 diferentes SPE-Gr, onde é possível observar uma boa estabilidade do sinal com baixo DPR de 2,8% (N=3), mostrando que método proposto apresenta uma boa reprodutibilidade para aplicação do SPE-Gr como um dispositivo eletroquímico descartável na detecção de EF. Sendo assim, foi avaliada a curva de calibração analítica para determinação da EF pelo método proposto na faixa de concentração de 1 a $1000 \mu\text{molL}^{-1}$ (Fig 36)

Figura 36 – AdSDPVs da EF em concentrações de 1,0 a 1000 μmolL^{-1} em tampão Borato 0.1 molL^{-1} (pH 10,0) no SPE-Gr. Inserções da regressão linear e do zoom dos menores sinais, correspondentes às concentrações de 1,0 a 50 μM . Tempo de acumulação de 4 min. Amplitude de 70 mV e velocidade de 40 mV s^{-1} .



Como esperado, a Figura 36 mostra que I_{pa} da EF aumenta em função do aumento da concentração do analito na solução, sendo obtida uma ampla faixa linear de três ordens de magnitude (1,0 a 1000 μmolL) com $r^2 = 0,994$, conforme mostrado na inserção da Figura 36. A respectiva equação da regressão linear desta curva analítica é dada por i (μA) = $0,031 (\pm 0,001) + 0,0065 (\pm 0,0003) \mu\text{A} / \mu\text{molL}^{-1}$. Baseada nesta equação e no ruído da linha de base do eletrólito suporte (branco) desses voltamogramas, o LOD e LOQ teóricos calculados foram de 0,165 e 0,545 μmolL^{-1} , respectivamente.

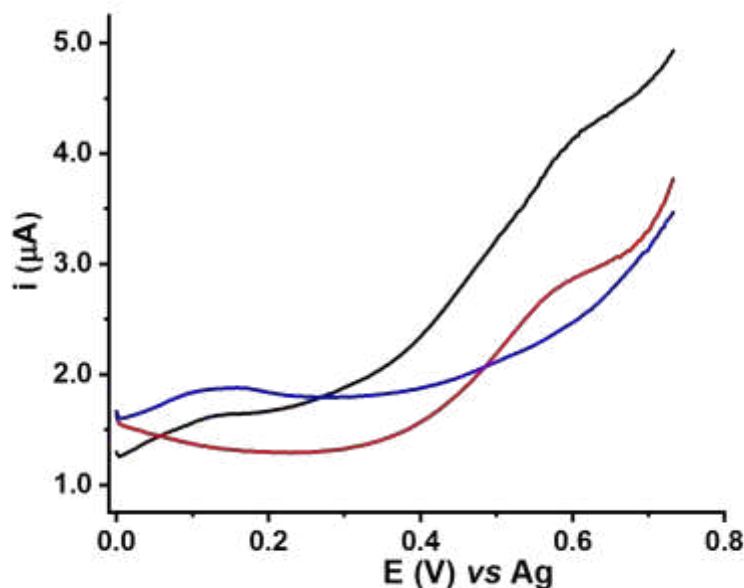
Vale destacar que, o sinal mensurável para quantificar a menor concentração desse analito é dado pelo menor ponto da curva, sendo a concentração de 1.0 μmolL^{-1} de EF. Dessa forma, o limite detectável para o fármaco neste trabalho (1,0 μmolL^{-1}), é suficiente para determinações precisas em amostras de urina, mesmo considerando que há diluição de dez vezes da amostra (WADA, 2020). Além disso, já foi relatado na literatura a presença de EF em amostras de chás comerciais, nos quais foram detectados uma quantidade de 0,65 % (m/m) do fármaco por meio de cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (BOFF et al., 2008). Levando em consideração que a massa de um sachê de chá pesa aproximadamente 1 g e é preparado em 200 mL de água, temos que a concentração molar de EF no chá é de

aproximadamente $160 \mu\text{molL}^{-1}$, levando em consideração que há diluição de 10 vezes do chá para realização da análise, a metodologia deve ser capaz de determinar concentrações próximas à $16 \mu\text{molL}^{-1}$. Além disso, a EF é proibida pela WADA quando a concentração dela na urina ultrapassar 10 microgramas por mililitro, o que equivale a uma concentração de aproximadamente $50 \mu\text{molL}^{-1}$. Sendo assim, o menor sinal mensurável encontrado no presente trabalho ($1,0 \mu\text{molL}^{-1}$) é baixo o suficiente para determinação de EF em casos já reportados de contaminação de chás dietéticos, bem como para aplicação no controle de doping.

4.2.4 Aplicação do método proposto em amostras de chá e estudos de adição e recuperação da EF.

A fim de verificar a possibilidade de detectar uma possível adulteração da EF em suplementos alimentares, bebidas dietéticas de chá foram avaliadas pelo método proposto. Nessas amostras também foram realizados estudo de adição e recuperação da EF (Figura 37). A Figura 37 mostra análises em amostras de chá diluído dez vezes em eletrólito suporte com e sem adição de $50 \mu\text{M}$ de EF, bem como uma comparação do voltamograma obtido apenas da solução padrão desse analito na mesma concentração.

Figura 37 - AdSDPVs registrados em amostra de chá diluída dez vezes (linha azul) em tampão borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$. EF a $50 \mu\text{molL}^{-1}$ em tampão borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (linha vermelha) e adicionada na amostra de chá (linha preta).

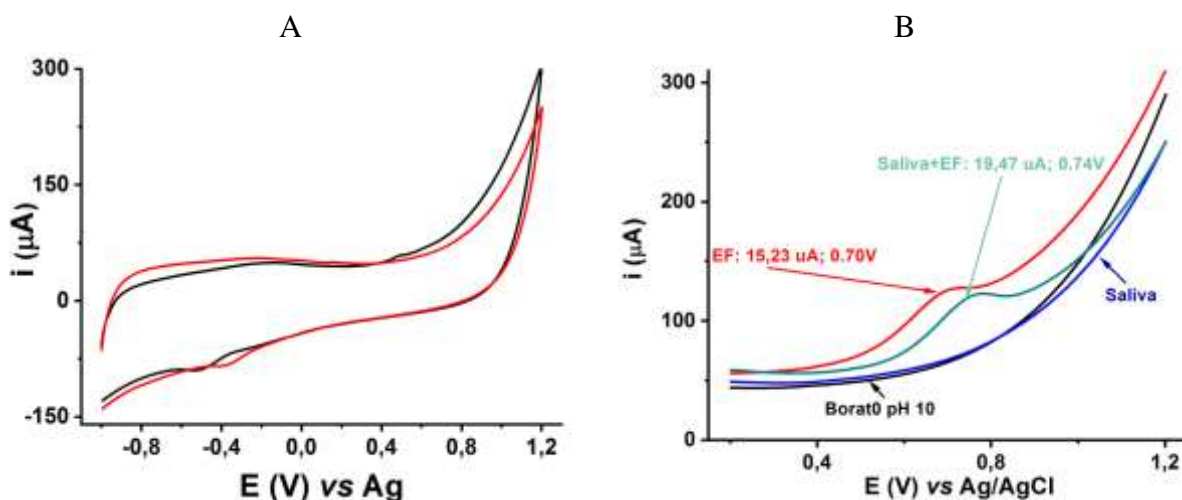


Os resultados mostrados na Figura 37 mostram que há um pico de oxidação desconhecido na amostra de chá em torno de 0,1 V (vs Ag), cujo pico não interfere no potencial de detecção de EF. Esse processo pode estar relacionado com a presença de antioxidantes na amostra utilizada. Além disso, no estudo de adição e recuperação verificou-se uma recuperação do sinal de EF na amostra de chá equivalente a 94,6% (N=3), sugerindo que não há interferência significativa dessa matriz para determinação desse estimulante. Portanto, o método proposto demonstra ser adequado para detectar a EF em chás dietéticos, proporcionando um método de triagem rápido para identificação de uma possível adulteração desses alimentos, cuja análise pode também auxiliar atletas no controle de doping.

4.2.5 Estudos para determinação da EF em amostras de Urina e Saliva

No sentido de avaliar a detecção da EF para controle de doping, amostras de saliva e urina foram avaliadas. Nesse sentido, foi realizado um estudo de uma solução de saliva natural extraída de um paciente saudável, conforme descrito na parte experimental. Os voltamogramas obtidos por VC e AdSDPV são apresentados na Figura 38A e 38B para saliva sem e com adição de EF, respectivamente.

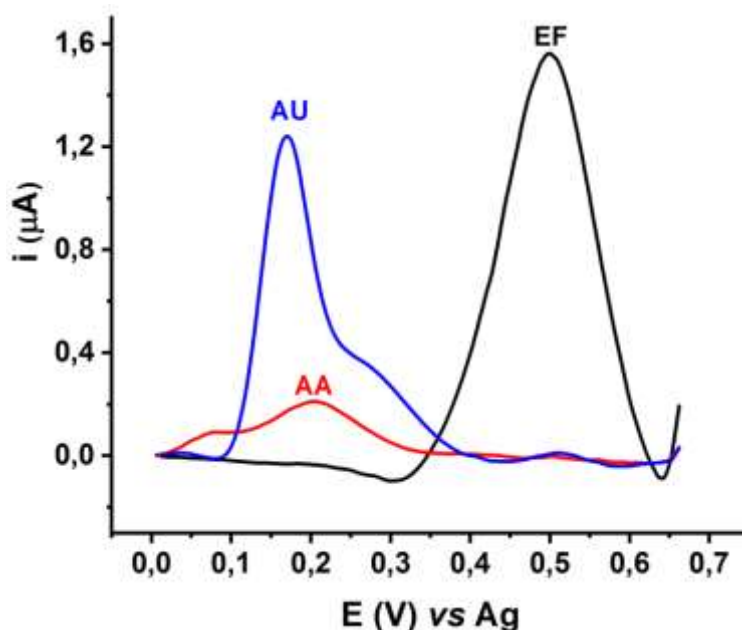
Figura 38 – (A) VCs registrados no SPE-Gr de tampão borato 0,1 molL⁻¹ (pH 10) (linha vermelha) e saliva diluída dez vezes no tampão borato (linha preta). Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. AdSDPV de tampão borato 0,1 molL⁻¹ (pH 10) (linha preta); saliva diluída dez vezes no tampão borato (linha azul); EF 50 μmolL⁻¹ (linha vermelha) e EF 50 μmolL⁻¹ + saliva diluída dez vezes (linha verde)



Como é possível observar pela VC na Figura 38A, a saliva, diluída 10 vezes no eletrólito suporte não apresentou nenhum processo de oxidação significativo no SPE-Gr, principalmente, em potenciais próximos da detecção da EF neste ET. Esse comportamento também foi corroborado usando as condições otimizadas pelo método proposto com a detecção por AdSDPV (Figura 38B), indicando que há possibilidade de análise de EF em amostras de saliva. Dessa forma, os estudos de adição e recuperação da EF foram avaliados, conforme mostrado nos voltamogramas obtidos pela AdSDPV na Figura 38. Todavia, uma recuperação de apenas 78 % da EF foi obtida na amostra de saliva, indicando que há efeito da matriz da amostra de saliva na análise de EF, o que inviabiliza a aplicação da curva de calibração normal do método proposto. Por outro lado, a determinação da EF em amostras de saliva poderia ser feita por meio de curvas de adição padrão, os quais não foram avaliadas neste trabalho. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho não podem confirmar a aplicação do método proposto para controle de doping de EF em amostras de saliva humana.

Outra possibilidade para aplicação do método proposto no controle doping de EF foi avaliada em amostras de urina. Inicialmente foi feito a comparação do sinal eletroquímico dos principais interferentes eletroativos presentes na urina: Ácido úrico (AU) e ácido ascórbico (AA). Foram feitos AdSVPD nas condições otimizadas para determinação da EF, como mostrado na figura 38.

Figura 39 - AdSDPV de ácido úrico $50 \mu\text{molL}^{-1}$ (linha azul); ácido ascórbico $50 \mu\text{molL}^{-1}$ (linha vermelha) e EF $50 \mu\text{molL}^{-1}$ (linha preta), todos em tampão borato $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (pH 10) nas condições otimizadas.



Como esperado, a Figura 38 mostra que o AA e AU são eletroativos no SPE-Gr, porém o E_{pa} da EF é distinto dos E_{pa} de AA e AU. Assim, o AA e AU não seriam potenciais interferentes para uma identificação de EF em amostras de urina. No entanto, como há uma grande quantidade desses ácidos na urina humana, um estudo em concentrações mais elevadas de AA e AU precisa ser realizado para confirmar a interferência desses compostos para determinação da EF. Portanto, até o presente momento, os resultados obtidos demonstraram de fato apenas a possibilidade de análise da EF em amostras de bebidas dietéticas, sendo possível apenas propor uma perspectiva para controle de doping desse estimulante em amostras biológicas.

4.2.6 Comparação do método proposto com outros métodos eletroanalíticos reportados para determinação da EF.

Comparação dos resultados obtidos para detectar a EF usando o método proposto por meio da AdSDPV com SPE-GR foi realizada frente aos demais métodos eletroanalíticos reportados para determinação deste analito, conforme é mostrado a Tabela 6.

Tabela 6: Comparação de alguns métodos para determinação eletroanalítica de EF

Técnica	ET	Faixa Linear (μmolL^{-1})	LOD (μmolL^{-1})	Sinal mensurável (μmolL^{-1})	Amostra	Referência
SWV	PCPE-PAA	60,0-1000	0,35	60,0	Urina e Formulações farmacêuticas	MERSAL, 2011
SWV e DPV	GCE modificado	6,0–100	0,03	6,0	Urina	AĞIN; ÖZTURK; KUL, 2021
Bia-SWV	BDDE	30,0-240	0,79	30,0	Chás e urina	FREITAS et al., 2021
DPV	Nafion-MWCNTs/GCE	0,18–75	0,072	0,18	Saliva	JIA et al., 2021
AdSDPV	SPE-Gr	1,0–1000	0,165	1,0	Chás	Este trabalho

A Tabela 6 mostra que o método proposto apresenta a melhor faixa linear de trabalho e o segundo menor sinal mensurável para detectar a EF, sendo apenas superior ao método reportado usando um eletrodo modificado com Nafion e nanotubos de carbono. Vale

destacar ainda que, o método proposto é único que utiliza um dispositivo descartável não modificado e de baixo custo como ET, o que confere uma maior simplicidade e portabilidade para aplicação na determinação da EF em amostras de chá.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de SB e EF em amostras de chás dietéticos usando, pela primeira vez, um simples SPE não modificado a base de carbono-grafite associado a detecção pela técnica de AdSDPV. No SPE-Gr a SB e EF apresentaram apenas um processo de oxidação irreversível em torno de 0,5 e 0,8 V, respectivamente. O controle do transporte de massa desses estimulantes na célula eletroquímica foi dado por adsorção para SB e um comportamento misto (difusão-adsorção) para EF no SPE-Gr. Os respectivos processos de oxidação desses estimulantes apresentaram o envolvimento de 1 elétron e 1 próton para ambos. A técnica de AdSDPV proporcionou ainda um aumento da sensibilidade para detectar esses estimulantes no SPE-Gr, aplicando um tempo de acumulação de 4 min para EF e 15 min para SB.

Assim, a técnica proposta nesse trabalho com SPE-Gr e detecção por AdSDPV mostrou alta sensibilidade para determinação de SB e EF com baixos LODs de 0,3 e 0,17 μmolL^{-1} , respectivamente. Além disso, considerando os níveis já encontrados e aceitáveis desses estimulantes em bebidas de chá (superiores a 0,5% (w/w)), o menor sinal mensurável apresentado para ambos analitos (2,0 μmolL^{-1} para SB e 1,0 μmolL^{-1} para EF), demonstram que o método proposto é suficientemente sensível para detectar e quantificar a SB e EF nessas amostras. Os estudos de adição e recuperação nas amostras de chá para ambos estimulantes mostraram resultados próximos à 100%, o que indica que não há interferência da matriz dessas amostras, podendo ser aplicado a quantificação desses analitos por meio de uma simples calibração externa.

Estudos realizados para determinação de EF em amostras de saliva e urina humana mostram que há perspectivas para determinação desse estimulante em amostras biológicas, podendo o método proposto ser também aplicado no controle de doping dessas drogas.

Desta forma, o presente trabalho demonstra a potencialidade de aplicação da técnica AdSDPV com um simples SPE-Gr para realizar uma identificação preliminar de SB ou EF em amostras de suplementos alimentares, como em bebidas de chá dietéticos que são vendidos como produtos naturais, possibilitando também uma triagem dessas amostras. Uma das grandes vantagens do método proposto é a portabilidade e possibilidade de miniaturização do sistema de detecção, o que torna sua aplicação atrativa para uma análise rápida e de baixo custo em amostras in loco, além de apresentar um baixo consumo de amostra (< 100 μL). Por fim, o método proposto pode ser também usado pelos atletas antes e durante competições

esportivas para verificar a presença de SB e EF em suplementos alimentares, uma vez que esses estimulantes são banidos no controle de doping pela WADA, podendo até ser justificado um doping positivo como não intencional pela contaminação desses alimentos.

6 PRODUÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO DO DOUTORADO

- LIMA, AMANDA B. ; DOS'SANTOS, WALLANS T. P. ; COMPTON, RICHARD G. Simple and Sensitive Determination of Sibutramine in Slimming Tea Beverages using a Carbon Screen-printed Electrode with Adsorptive Stripping Voltammetry. *ELECTROANALYSIS* , v. 31, p. 975-980, 2019.
- LIMA, AMANDA B. ; DE OLIVEIRA, FERNANDO M. ; GUEDES, TIAGO DE J. ; SOUSA, RAQUEL M.F. ; MUNOZ, RODRIGO A.A. ; DOS SANTOS, WALLANS T.P. Altered electrochemistry of oxcarbazepine on cathodically treated boron-doped diamond electrode: Selective detection by pulsed amperometric detection coupled to flow-injection analysis. *ELECTROCHIMICA ACTA* , v. 260, p. 564-570, 2018.
- BARBOSA'LIMA, AMANDA ; FERREIRA, LUCAS FRANCO ; BARBOSA, SANDRO LUIZ ; DE'SOUZA'GIL, ERIC ; AMORIM' BEZERRA 'DA' SILVA, RODRIGO ; PIO 'DOS' SANTOS, WALLANS TORRES . Selective Determination of Verapamil in Pharmaceuticals and Urine Using a Boron-doped Diamond Electrode Coupled to Flow Injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection. *ELECTROANALYSIS* , v. 30, p. 1880-1885, 2018.
- SOUZA, GLAYTON A. ; PIMENTEL, DILTON M. ; LIMA, AMANDA B. ; GUEDES, TIAGO J. ; ARANTES, LUCIANO C. ; DE OLIVEIRA, ANDERSON C. ; SOUSA, RAQUEL M. F. ; MUÑOZ, RODRIGO A. A. ; DOS SANTOS, WALLANS T. P. Electrochemical sensing of NBOMes and other new psychoactive substances in blotting paper by square-wave voltammetry on a boron-doped diamond electrode. *Analytical Methods* , v. 10, p. 2411-2418, 2018.
- DE OLIVEIRA, FERNANDO M. ; DE J. GUEDES, TIAGO ; LIMA, AMANDA B. ; DA SILVA, LEONARDO M. ; DOS SANTOS, WALLANS T.P. . Alternative method to obtain the Tafel plot for simple electrode reactions using batch injection analysis coupled with multiple-pulse amperometric detection. *ELECTROCHIMICA ACTA*, v. 13, p. 1-1, 2017.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AĞIN, F.; ÖZTURK, G.; KUL, D. Voltammetric Analysis of Ephedrine in Pharmaceutical Dosage Forms and Urine Using poly(Nile Blue A) Modified Glassy Carbon Electrode. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 24, p. 366-375, 2021.
- AHMAR, H.; FAKHARI, A. R. Electro-oxidation and adsorptive stripping voltammetric determination of ephedrine and pseudoephedrine at carboxylated multi-walled carbon nanotube-modified electrode. **Analytical Methods**, v. 4, p. 812-818, 2012.
- ALEIXO L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Revista Chemkeys**, v. 3, p. 1-21, 2018.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, V. 1, P. 1-21, 2003.
- AN, Q.; DONG, Y. M.; LU, N. W.; LI, N. Micelar liquid chromatographic method for the determination of ephedrine and pseudoephedrine in human serum by direct inject of the sample with simple dilution. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, p. 177-183, 2017.
- ANVISA, Farmacopeia Brasileira 5ª edição, vol. 2, 2010, Brasília-DF: Anvisa 853.
- AQUINO NETO, F. R.; MARQUES, M. A. S.; MARCELO, H.; PEREIRA, G. Controle de dopagem no esporte: aspectos químicos e farmacológicos que afetam a detecção de drogas no cabelo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 259-271, 2002.
- ASHOURNIA, M.; ALIAKBAR, A. Determination of Se(IV) in natural waters by adsorptive stripping voltammetry of 5-nitropiazselenol. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 788–794, 2010.
- AVULA, B.; WANG, M.; SAGI, S.; COHEN, P. A.; WANG, Y. H.; LASONKAR, P.; CHITTIBOYINA, A. G.; FENG, W.; KHANA, I. A. Identification and quantification of 1,3-dimethylbutylamine (DMBA) from *Camellia sinensis* tea leaves and dietary supplements. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 159-168, 2015.
- BADEA, M.; di MODUGNO, F.; FLOROIAN, L.; TIT, D. M.; RESTANI, P.; BUNGAU, S.; IOVAN, C.; BADEA, G. E.; ALEYA, L. Electrochemical strategies for gallic acid detection: Potential for application in clinical, food or environmental analyses. **Science of The Total Environment**, v. 672, p. 129-140, 2019.
- BAGHERI, H.; PAJOOHESHPOUR, N.; AFKHAMI, A.; KHOSHSAFARD, H. Fabrication of a novel electrochemical sensing platform based on core-shell nano-structured/molecularly

imprinted polymer for sensitive and selective determination of ephedrine. **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 51135-51145, 2016.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. John Wiley and Sons; New York, 2001.

BOFF, B. S.; SEBEN, V. C.; PALIOSA, P. K.; AZAMBUJA, I.; SINGER, R. B.; LIMBERGER, R. P. Investigação da presena de efedrinas em *Ephedra tweediana* Fisch & C.A. Meyer e em *E. triandra* Tul. (Ephedraceae) coletadas em Porto Alegre/RS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18. p. 394-401,2008.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicaes**. Oxford University Press, 1996, v.5, p. 236-244.

BRETT, A.M.; BRETT, C.M.A. *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicaes*. Coimbra, Livraria Almedina, 1996, 470 p.

CARREIRA, F.C. **Determinao de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia de alta eficiência**. Dissertao, Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2008.

CARVALHO, J. M.; da SILVA, A. R.; da CUNHA, A. L. M. C.; AUCELIO, R. Q.; ALBERTI, A. L. M.; LEANDRO, K. C. Voltammetric Determination of Sibutramine in Beverages and in Pharmaceutical Formulations. **Química Nova**, v. 35, p. 988-992, 2012.

CARVALHO, L. M.; MARTINI, M.; MOREIRA, A. P. L.; LIMA, A. P. S.; CORREIA, D.; FALC O, T.; GARCIA, S. C.; BAIROS, A. V.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination. **Forensic Science International**. v. 204, p. 6-12, 2011.

CEBI, N.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. A rapid ATR-FTIR spectroscopic method for detection of sibutramine adulteration in tea and coffee based on hierarchical cluster and principal component analyses. **Analytical Methods**, v. 229, p. 516-526, 2017.

CHEMICALIZE. Ephedrine. Disponível em:
<<https://chemicalize.com/app/calculation/ephedrine>>. Acesso em 30 de janeiro de 2022.

CHEMICALIZE. Sibutramine. Disponível em:
<<https://chemicalize.com/app/calculation/sibutramine>>. Acesso em 30 de janeiro de 2022.

CHICHARRO, M.; ZAPARDIEL, A.; BERMEJO, E.; PÉREZ, J. A.; HERNÁNDEZ, L. Determination of ephedrine in human urine using a glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 273, p. 361-368, 1993.

COLOMBELI, A. S. S. Avaliação do potencial de interferência analítica de fármacos na análise química do exame de urina. 172 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

COSTA-RAMA, E.; FERNANDEZ-ABEDUL, M. T. Paper-Based Screen-Printed Electrodes: A New Generation of Low-Cost Electroanalytical Platforms. **Biosensors**. v. 11. p. 51-73, 2021.]

da COSTA, B. R. B.; de la CRUZ, M. N. S; ROIFFÉ, R. R.; PADILHA, M. C. Food supplements: an unintended doping source?. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 24. p. 1-16, 2021.

Da SILVA, W. C. Determinação simultânea de paracetamol e cafeína em formulações farmacêuticas usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica. 2011. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

de HON, O.; COUMANS, B. The continuing story of nutritional supplements and doping infractions. **British Journal of Sports Medicine**. v. 41. p. 800–805, 2007.

DENG, D.; DENG, H.; ZHANG, L.; SU, Y. Determination of ephedrine and pseudoephedrine by Field-Amplified sample injection capillary electrophoresis. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, p. 357-362, 2014.

DOMINGUEZ-RENEDO, O.; CALVO, M. E. B.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; ARCOS-MARTINEZ, M. J. Oxcarbazepine Analysis by Adsorptive Stripping Voltammetry Using Silver Nanoparticle-Modified Carbon Screen-Printed Electrodes. **Sensor Letters**. v. 8. p. 268-272, 2010.

dos SANTOS W. T. P.; AMIN, H. M. A.; COMPTON, R. G. A nano-carbon electrode optimized for adsorptive stripping voltammetry: Application to detection of the stimulant selegiline in authentic saliva. **Sensors and Actuators B-Chemical**. v. 279, p. 433-439, 2019.

dos SANTOS, W. T. P.; COMPTON, R. G. A simple method to detect the stimulant modafinil in authentic saliva using a carbon-nanotube screen-printed electrode with adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators B-Chemical**. v. 285, p. 137-144, 2019.

DROPSSENS. DropSens: Screen-printed electrodes. Disponível em: http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html. Acesso em: 16 janeiro de 2022.

El GOHARY, N. A.; El NASHAR, R. M.; ABOUL-ENIEN, H. Y. Potentiometric Determination of Sibutramine Using Batch and Flow Injection. **Analytical Letters**. v. 44. p.

241-257, 2011.

FATIBELLO-FILHO, O. **Equilíbrio Iônico: Aplicações em Química Analítica**. 1 ed. São Carlos: EDUFSCar, 2016.

FDA, Merita label, Disponível em:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020632_s0321bl.pdf, acesso em , 14/11/2019.

FORTE, R. Y.; PRECOMA-NETO, D.; CHIMINACIO NETO, MAIA, N. F.; FARIA-NETO, J. R. Infarto do Miocárdio em Atleta Jovem Associado ao Uso de Suplemento Dietético Rico em Efedrina. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 87 p. 179-181, 2006.

FRASER, D. B.; TOMLINSON, J.; TURNER, J.; SATZGER, R. D. Determination of undeclared prescription drugs in black pearl products. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 5, p. 329-336, 1997.

FREITAS, J. M.; OLIVEIRA, T. C.; SANTANA, M. H. P.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast-portable method for the screening of the appetite-suppressant drug sibutramine in natural products and multivitamins supplements. **Sensors and Actuators B**, v. 282, p. 449-456, 2019.

FREITAS, J. M.; SILVA, P. R. L.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and portable voltammetric method for the determination of the amphetamine adulterant ephedrine in natural over-the-counter weight-loss products. **Microchemical Journal**. v. 160. p. 105757-105765, 2021.

GASPAR, R.; LIMA M. L.; SEIBT, B.; CARVALHO, J. B. C. Novas media sociais na comunicação de benefícios e riscos alimentares: o caso das crises alimentares na Europa. **Riscos e Alimentos**, v. 3, p. 1-33, 2012

GUYTON, A. C.; Fisiologia Humana, 6ª edição, Editora Guanabara e Koogan, Rio de Janeiro, 1988.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

HASSO, M.; SARAKHMAN, O.; STANKOVIC, D. M.; SVORC, L. A new voltammetric platform for reliable determination of the sport performance-enhancing stimulant synephrine in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**. v. 12. p. 4749–4758, 2020.

- JIA, L.; MAO, .; ZHANG, S.; LI, H.; QIAN, M.; LIU, D.; QI, B. Electrochemical switch sensor toward ephedrine hydrochloride determination based on molecularly imprinted polymer/nafion-MWCNTs modified electrode. **Microchemical Journal**. v. 164. p. 105981, 2022.)
- JUNG, J.; HERMANN-CLAUSEN, M.; WEINMANN, W. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. **Forensic Science International**. v. 161. p. 221-222, 2006.
- KARASTOGIANNI, S.; GIROUSI, S. Square Wave Voltammetric (SWV) Determination of Cyanocobalamin (Vitamin B12) in Pharmaceuticals and Supplements on a Carbon Paste Electrode (CPE) Modified by a Manganese(II) Polymeric Film. **Analytical Letters**. v. 55, p. 399-410, 2022.
- KASTRATI, G.; JASHARI, G.; SYS, M.; SVECOVA, B.; ARBNESHI, T.; METELKA, R.; BILKOVA, Z.; KORECKA, L. Simultaneous Determination of Vitamin E and Vitamin K in Food Supplements Using Adsorptive Stripping Square-Wave Voltammetry at Glassy Carbon Electrode. **Applied Sciences**. v. 10. p. 4759 - 4771, 2020.
- KHALOO, S. S.; MOZAFFARI, S.; ALIMOHAMMADI, P.; KARGAR, H.; ORDOOKHANIAN, J. Sensitive and Selective Determination of Riboflavin in Food and Pharmaceutical Samples Using Manganese (III) Tetrphenylporphyrin Modified Carbon Paste Electrode. **International Journal of Food Properties**. v. 19, p. 2272-2283, 2016.
- KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R.; Laboratory techniques in electroanalytical chemistry, Marcel Dekker: New York, 1984. 751 p
- KOEHLER, K.; GEYER, H.; GUDDAT, S.; ORLOVIUS, A.; PARR, M. K.; THEVIS, M.; MESTER, J.; SCHÄNZER, W. Sibutramine Found in Chinese Herbal Slimming Tea and Capsules. **Sportverlag Strauß**, v. 15, p. 367-370, 2007.
- KRUG, O.; THOMAS, A.; WALPURGIS, K.; PIPER, T.; SIGMUND, G.; SCHÄNZER, W.; LAUSSMANN T.; THEVIS, M. Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010–2013. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 70, p. 1303-1311 , 2014.
- LI, M.; LI, Y. T.; LI, D. W.; LONG, Y. T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-a review. **Analytica Chimica Acta**. v. 734. p. 31–44, 2012.
- MARTINI, M.; DE CARVALHO, L. M.; BLASCO-BLASCO, A. ; DOMÉNECH-CARBÓ, A. Screening and authentication of herbal formulations based on microextraction-assisted voltammetry of microparticles. **Analytical Methods**. v. 7, p. 5740-5747, 2015.
- MASSONI, T.; SUYENAGA, E. S. Sibutramine from the perspective of medicinal **chemistry sibutramina en perspectiva de la química medicinal**. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, p. 59 - 68, 2012.

MERWE, P. J.V. D.; GROBBELAAR, E. Unintentional doping through the use of contaminated nutritional supplements. **South African Medical Journal**, v. 95, p. 510-511, 2005.

MIRANDA, J. A. T.; CUNHA, R. R.; GIMENES, T. D.; MUNOZ, R. A. A.; RICHER, E. M. Determinação simultânea de ácido ascórbico e acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada. **Química Nova**, v. 37, p. 1459-1463, 2012.

MOURA, S. A. B.; MEDEIROS, A. M. C.; COSTA, F. R. H.; MORAES, P. H.; OLIVEIRA FILHO, S.A. Valor diagnóstico da saliva em doenças orais e sistêmicas: uma revisão de literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**. v. 7, p. 187-194, 2007.

MOUSTAFA, A .A.; HEGAZY, M. A.; MOHAMED, D.; ALI, O. Novel approach for the simultaneous determination of carbinoxamine maleate, pholcodine and ephedrine hydrochloride without interference from coloring matter in an antitussive preparation using smart spectrophotometric methods. **Journal of AOAC International**, v. 101, p. 414-426, 2018.

NARIMANI, O.; DALALI, N.; ROSTAMIZADEH, K. Funcionalized carbono nanotube / ionic liquid-coated wire as a new fiber assembly for determination of methamphetamine and ephedrine by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, p. 8645-8653, 2014.

NUNES, L. A. S.; MACEDO, D. V. Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, p. 247-255, 2013.

OLIVEIRA, N. V. B. V.; SZABO, I.; BASTOS, L. L.; PAIVA, S. P. Atuação profissional dos farmacêuticos no Brasil: perfil sócio demográfico e dinâmica de trabalho em farmácias e drogarias privadas. **Saúde e Sociedade**, v. 26, p. 1105-1121, 2017.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**. v. 5. p. , 516-537, 2013

PACHECO, W. F.;SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista virtual de Química**, v. 5 p. 516-537, 2013.

POMERANZ, J. L.; BARBOSA, G.; KILLIAN, C.; AUSTIN, B. The Dangerous Mix of Adolescents and Dietary Supplements for Weight Loss and Muscle Building. **Journal of Public Health Management and Practice**. v. 21, p. 496-503, 2015.

RASCOVSKI, A.; MILLNER, T. H.; BATALHA, L.; REIS, C.; MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Eficácia e Tolerabilidade das Substâncias Calorigênicas: Ioimbina, Triiodotironina, Aminofilina Combinada a Efedrina e Fenilpropanolamina no Tratamento da Obesidade a Curto Prazo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44 p. 95-102, 2000.

SARVESTANI, M. R. J.; AHMADI, R. Determination of Mn²⁺ in Pharmaceutical Supplements by a Novel Coated Graphite Electrode Based on Zolpidem as a Neutral Ion Carrier. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**. v. 5, p. 273-284, 2018.

SCHÜTZEMBERGER, M. E.; SOUZA, R. T.; PETRUCCI, R. E.; MACHADO, M. A. N.; PAPALEXIOU, V.; BRANCHER, J. A. Biochemical analysis of saliva of subjects with periodontal disease. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**. v. 4. p. 46-52, 2007.

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH ET AL. FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA. 8ª EDIÇÃO, CENGAGE LEARNING, SÃO PAULO, 2009.

SOLTANI, H.; PARDAKHTY, A.; AHMADZADEH, S. Determination of hydroquinone in food and pharmaceutical samples using a voltammetric based sensor employing NiO nanoparticle and ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**. v. 219, p. 63-67, 2016.

SOUZA, K. A. O.; NUNES, A. M. F.; PIMENTEL, D. M.; VERLY, R. M.; GIL, E. S.; MALAGUTTI, A. R.; dos SANTOS, W. T. P. Altered electrochemistry of amiloride drug on boron-doped diamond electrode: Rapid and selective detection in urine by square-wave cathodic stripping voltammetry for application in doping control. **Electrochimica Acta**. v. 373. p. 137891- 137901, 2021.

SQUISSATO, A. L. Eletrodos impressos descartáveis: Aplicações em amostras ambientais, alimentícias e combustíveis. 2019. 183 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

STRANO-ROSSI, S.; COLAMONICI, C.; BOTRÈ, F. Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: Perspectives for “in competition” anti-doping analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 217–222, 2008.

TERADAL, N. L.; NARAYAN, P. S.; JALADAPPAGARI, S. Electro-reduced graphene oxide film modified glassy carbon electrode as an electrochemical sensor for sibutramine. **Analytical Methods**, v. 5, p. 7090-7095, 2013.

THOMAS N. TOZER (AUTOR), MALCOLM ROWLAND Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica - As bases quantitativas da terapia farmacológica Capa comum - 1 abril

2009 : Artmed; 1ª edição (1 abril 2009) porto alegre

THUYNE, W. V.; EENOO, P. V.; DELBEKE, F. T. Nutritional supplements: prevalence of use and contamination with doping agents. **Nutrition Research Reviews**. v. 19, p. 147–158, 2006.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica**. 2. ed. São Paulo: Editora Da Universidade de São Paulo, 2005. 220 p.

TOH, H. S.; BATCHELOR-MCAULEY, C.; TSCHULIK, K.; UHLEMANN, M.; CROSSLEY, A.; COMPTON, R. G. The anodic stripping voltammetry of nanoparticles: electrochemical evidence for the surface agglomeration of silver nanoparticles. **Nanoscale**. v. 5. p. 4884–4893, 2013.

TSCHOLL, P.; ALONSO, J. M.; DOLLÉ, G.; JUNGE, A.; DVORAK, J. The use of drugs and nutritional supplements in top-level track and field athletes. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 38. p. 133-140, 2010

WADA, The Prohibited List, 1 de janeiro de 2019. Disponível em < <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/the-prohibited-list> >. Acesso em 14 nov. 2019.

WANG, H. W.; BRINGANS, C.; HICKEY, A. J. R.; WINDSOR, J. A.; KILMARTIN, P. A.; PHILLIPS, A. R. J. Cyclic Voltammetry in Biological Samples: A Systematic Review of Methods and Techniques Applicable to Clinical Settings. **Signals**. v. 2. p. 138–158, 2021.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, John Wiley & Sons, 2006.

WANG, J.; PEDRERO, M.; SAKSLUND, H.; HAMMERICH, O.; PINGARRON, J. Electrochemical Activation of Screen-printed Carbon Strips. **Analyst**, v. 121, p. 345-350, 1996.

WANG, J.; TIAN, B.; NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. **Electrochimica Acta**, v. 43, p. 3459-3465, 1998.

WONG, P. H. B.; HARNETT, J. E.; CLASES, D.; WHEATE, N. J. An Analysis for Adulteration and Contamination of Over-the-Counter Weight-Loss Products. **AAPS PharmSciTech**. v. 22, p. 78 – 84, 2021.

ZABIHOLLAHPOOR, A.; RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR-DARZI, G.; MOGHADAMNIA, A. A.; **Recent advances in electroanalytical methods for the therapeutic monitoring of antiepileptic drugs: A comprehensive review**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. v. 188. p. 113394-113404, 2020

ZAYED, S. I. M.; ISSA, Y. M. Sibutramine Selective Electrodes for Batch and Flow Injection

